

**Untersuchungen zur
Methodik der automatischen
Aminosäurenbestimmung
am biologischen Material**

**(Studiert an der Aminosäurezusammensetzung
der Pansenpopulation von Rindern)**

Hanspeter Petry

1967

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann

UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODIK DER
AUTOMATISCHEN AMINOSÄURENBESTIMMUNG
AM BIOLOGISCHEN MATERIAL

(Studiert an der Aminosäurezusammensetzung der
Pansenpopulation von Rindern)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Hanspeter Petry

aus

Landau/Pfalz

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. A. HERRLICH

Referent: Prof. Dr. Dr. Johs. BRÜGGEMANN

Tag der Promotion: 27. Februar 1967 .



MEINER LIEBEN MUTTER
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATUR	3
Stoffwechselvorgänge im Pansen	3
Möglichkeiten der Identifizierung und der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren	11
Möglichkeiten zur Trennung eines Amino- säurengemisches	11
Ionenaustauscher	12
Die Trennung eines Aminosäurengemisches mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie	15
Ninhydrinreaktion	16
Grundlagen der colorimetrischen Meßmethode	18
C. METHODIK	21
Das Prinzip der automatischen Aminosäurenbestimmung mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie	21
Technische Geräte	23
Reagentien	29
Analysengang	34
Füllen der Trennsäulen	36
Herstellen der Hydrolysate	37
Eichkurven, Eichlösungen	38
Testversuche an der Apparatur	39
Bemerkungen zur Methodik	47

D. MATERIAL	50
Jungbullenmastversuch	50
Gewinnung des Materials	52
E. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	54
F. ZUSAMMENFASSUNG	64
G. LITERATURVERZEICHNIS	66

LEBENS LAUF

A. EINLEITUNG

Bezüglich der Ernährung unterscheiden sich die Wiederkäuer von den Omnivoren und Carnivoren besonders dadurch, daß sie die mit der Nahrung aufgenommenen Nährstoffe erst nach Passage einer "Veredelungsfabrik", dem Pansen, zur Resorption kommen lassen. Diese Wertsteigerung hat besondere Bedeutung für die Proteine, deren biologische Wertigkeit (gemessen an Nicht-Wiederkäuern) im aufgenommenen Futter nicht ausreicht, um den Bedarf an allen Aminosäuren für die Synthese körpereigener Proteine im Intermediärstoffwechsel zu decken. Die in den Nahrungsproteinen enthaltenen Aminosäuren müssen also, soll der Wiederkäuer am Leben erhalten werden und Leistungen hervorbringen, so umgewandelt werden, daß die absoluten Mengen und Relationen der resorbierten N-haltigen Substanzen den Anforderungen des Intermediärstoffwechsels entsprechen.

Die durch mikrobielle Synthese während der Pansenpassage bedingte Steigerung der biologischen Wertigkeit der stickstoffhaltigen Nahrungsbestandteile wurde wiederholt ermittelt (ELLIS et al. 1956; DUNCAN et al. 1953; McNAUGHT et al. 1950). Über die Veränderungen der Aminosäurenkonzentrationen im Verlaufe des Pansendurchganges ist jedoch bisher wenig gearbeitet worden (WELLER et al. 1957; HÖLLER und HARMEYER, 1964). Es wurde mir daher die Aufgabe gestellt, die Aminosäurezusammensetzung eines möglichst repräsentativen Anteils an Pansenmikroorganismen bei Durchführung eines Bullenmastversuches mit Harnstoff zu ermitteln.

Methodisch sollte eine automatisch arbeitende Apparatur zur Aminosäurenbestimmung Verwendung finden. SPACKMAN, MOORE und STEIN (1958) haben als erste eine solche Analysenmethode für Aminosäuren beschrieben. Diese Apparatur wurde im Laufe der Zeit durch wesentliche Erkenntnisse weiter verbessert und ist heute als gebrauchsfertiges Laborgerät erhältlich. 1958 wurde auch am hiesigen Institut eine Apparatur zur automatischen Aminosäurenbestimmung erstellt. Langjährige methodische Erfahrungen und neuere Erkenntnisse ließen es jedoch wünschenswert erscheinen, vor Inangriffnahme des neuen Problems eine Modernisierung der Apparatur vorzunehmen. Nach Fertigstellung und Erprobung der von mir verbesser-

ten Apparatur sollte dann die Zusammensetzung der Aminosäuren der Pansenpopulation untersucht und eine eventuelle Veränderung des Aminosäurenmusters der Pansenmikroorganismen durch verschiedenartige Fütterung der Versuchstiere festgestellt werden.

B. LITERATUR

Stoffwechselvorgänge im Pansen

Die als Pansengärung bezeichneten Vorgänge im Vormagen der Wiederkäuer stellen eine mikrobielle Zerlegung der Futterstoffe dar und erfolgen im Wechselspiel mit der mechanischen Mundverdauung. Da eine Bildung wirtseigener Fermente und Verdauungssäfte im Pansen nicht stattfindet, beherrschen die anaeroben Ab- und Umbauvorgänge mit Hilfe mikrobieller Fermente den Abbau der Nahrungsbestandteile völlig. Für den pflanzenfressenden Wiederkäuer ist dabei die bakterielle Cellulaseproduktion von lebenswichtiger Bedeutung, da Wirbeltiere nicht imstande sind, dieses Ferment zu bilden. Im nachfolgenden soll von diesen mikrobiellen Vorgängen die Rede und das Hauptaugenmerk auf den Proteinstoffwechsel gerichtet sein.

Bei der Zerlegung der Kohlenhydrate wie Cellulose, Hemicellulosen, Stärke, Pektine und der verschiedenen Zuckerarten entstehen neben den niederen Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure auch Milchsäure und Spuren höherer Fettsäuren. Die gebildeten Gase Methan und Kohlensäure werden durch Ruktus aus dem Vormagen entleert.

Das beim Fettabbau entstehende Glycerin wird ebenso wie die Kohlenhydrate fermentativ umgesetzt, die Fettsäuren weitgehend abgebaut, auch teilweise umgebaut.

Der Abbau der Proteine erfolgt über die Peptide zu den Aminosäuren. Durch reduktive Desaminierung der Aminosäuren entstehen kurzkettige Fettsäuren und als wichtigstes Abbauprodukt Ammoniak. Schwefelwasserstoff wird bei der Zerlegung der Thioaminosäuren frei.

Weiterhin ist die Hydrolyse von Harnstoff aus dem Speichel und dem Blut in Ammoniak, Kohlendioxyd und Wasser durch Bakterienurease zu beachten. Durch den schnellen Abbau im Pansen besteht ein ständiges Konzentrationsgefälle für Harnstoff vom Blut in den Pansen (HÖRNICKE 1964). Der Übertritt von Harnstoff in den Vormagen ist dadurch von Schwankun-

gen des Blutharnstoffspiegels unabhängig.

Neben dem Abbau der Nahrungsstoffe laufen infolge des ständigen mikrobiellen Zellwachstums auch synthetische Prozesse im Pansen ab. Zu den dabei erzeugten Verbindungen gehören mikrobielle Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und Vitamine; doch nur für die beiden letztgenannten Stoffgruppen konnte ihre Bedeutung für den Stoffwechsel des Wiederkäuers bisher eingehender ermittelt werden. Heute weiß man, daß die Pansenbakterien zum Aufbau aller wasserlöslichen Vitamine (Vitamin-B-Komplex) und des Vitamins K befähigt sind und den Wiederkäuer damit von einer oralen Zufuhr dieser Wirkstoffe unabhängig machen (KON und PORTER 1953).

Die im Jahre 1891 von ZUNTZ sowie von HAGEMANN aufgestellte Hypothese, daß die Pansenbakterien Amide in Mikrobeneiweiß umzuverwandeln vermögen und dann selbst dem Wiederkäuer als Proteinquelle zur Verfügung stehen, ist inzwischen durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt worden, wie kürzlich CRASEMANN (1964) zusammenfassend dargestellt hat. Infolge der mikrobiellen Proteinsynthesen aus einfachen Stickstoffverbindungen wird in der Fütterung des Wiederkäuers ein teilweiser Ersatz des Nahrungseiweißes durch Nichtprotein-Stickstoff (NPN), wofür Harnstoff besonders geeignet erscheint, möglich. So zeigten BRÜGGEMANN et al. (1962) in einem Fütterungsversuch an Jungbullen, daß sich Sojaschrot wirkungsgleich durch ein Harnstoffbeifutter ersetzen läßt, wenn ein rohproteinarmes Grundfutter verabreicht wird.

Wie alle Tiere ist auch der Wiederkäuer auf die Deckung seines intermediären Stickstoffbedarfs durch Aminosäuren angewiesen, er benötigt aber diese Eiweißbausteine nicht in der Nahrung, da die sich laufend im Pansen vermehrenden Mikroben nach dem Übertritt des Panseninhaltes im Labmagen und Darm verdaut werden und somit die in ihrem Protein enthaltenen Aminosäuren zur Resorption zur Verfügung stehen.

Zum Aufbau zelleigenen Proteins verwenden die Bakterien den beim Abbau der Proteine bzw. Aminosäuren oder anderer N-haltiger Substanzen entstehenden Ammoniak. Allgemein läßt sich sagen, daß viele im Pansen lebenden Bakterienarten in der Lage sind, die zum Aufbau ihres Zelleiweißes benötigten Aminosäuren unter Verwendung von Nichtprotein-Stickstoff zu bilden. Besonderes Interesse für das Wirtstier haben die dabei synthetisierten Aminosäuren, die in dessen Intermediärstoffwechsel nicht gebildet wer-

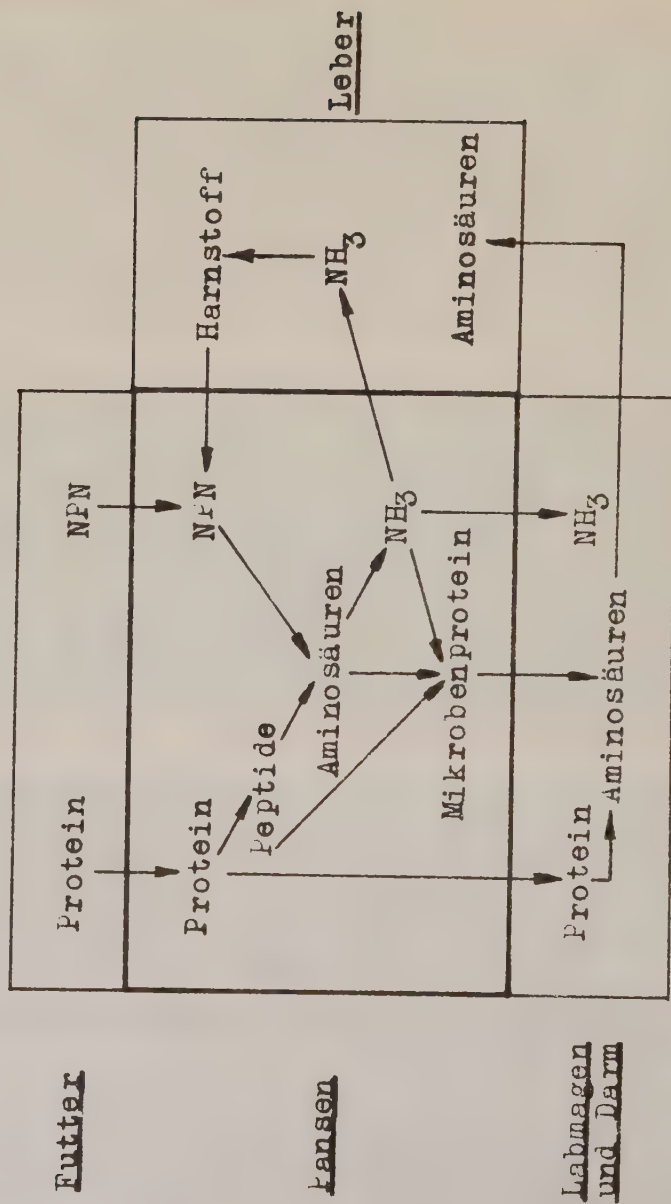
den können (Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Cystein, Methionin, Lysin, Phenylalanin, Histidin und Tryptophan). Steigernd auf die Aminosäuresynthese wirken schnell vergärbare Kohlenhydrate. Sie liefern den Mikroben die zur Synthese nötige Energie und die zur Aminosäureneubildung erforderlichen Kohlenstoffverbindungen. In diesem Zusammenhang läßt sich auch die Feststellung von ORTH und KAUFMANN (1961) erklären, daß die Aufwertung des Futtereweißes durch stärkereiche Fütterung bemerkenswert begünstigt wird. Zur Bildung der Thioaminosäuren wird der im Pansen reichlich vorhandene Sulfatschwefel verwendet. Wie aus Beobachtungen von MÜLLER und KRAMPITZ (1955) hervorgeht, sind die Protozoen an der Verwertung von radioaktiv markiertem Sulfat für die Proteinsynthese nicht beteiligt.

Einen Überblick über den Stoffwechsel der mit dem Futter aufgenommenen Stickstoffverbindungen im Pansen vermittelt die in Anlehnung an ANNISON und LEWIS (1959) wiedergegebene Abbildung 1 (S. 6). Ein Teil des Nahrungsproteins passiert wenig verändert den Pansen, während ein anderer Teil einen mehr oder weniger starken Abbau erfährt. Zur Synthese des Mikroben-eiweißes wird nicht nur die letzte Abbaustufe, der Ammoniak, verwendet, sondern auch Peptide und Aminosäuren, wie sie schon in den Nahrungsproteinen bzw. zum Teil in den nichteweißartigen Substanzen vorgebildet sind. Im Pansen wird nach Untersuchungen von WELLER et al. (1958) der im pflanzlichen Protein gebundene und der gelöst vorliegende Stickstoff überwiegend in Mikrobeneiweiß eingebaut.

Der Stickstoff, der beim Wiederkäuer in die distal vom Pansen gelegenen Darmabschnitte gelangt, ist damit zum größten Teil in Form von Aminosäuren im Zelleiweiß der Mikroorganismen gebunden. Wie WELLER et al. (1958; 1962) in verschiedenen Versuchen an mit Weizenheu gefütterten Schafen gezeigt haben, entfallen von dem Gesamtstickstoff im Pansen etwa 61 - 82% auf in den Mikroorganismen gebundenen Stickstoff, 10 - 27% auf pflanzlichen Stickstoff und etwa 5 - 10% auf löslichen Stickstoff. Der Mikrobenstickstoff setzt sich aus 45 - 50% Bakterienstickstoff und 20 - 25% Protozoenstickstoff zusammen.

Um der Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Pansenbakterien zu begegnen, die durch die große Schwierigkeit einer sauberen Abtrennung der auf das Pflanzenmaterial, auf die Bakterien sowie die Protozoen entfallenden Stickstofffraktionen entstand, benutzten WELLER et al. die nur bei den

Übersicht über den Stoffwechsel der im Futter aufgenommenen stickstoffhaltigen Substanz nach ANNISON und LEWIS (1959)



Bakterien vorkommende Diaminopimelinsäure als quantitativen Indikator.

Einer älteren Arbeit von McNAUGHT et al. (1950) zufolge beträgt der Proteingehalt getrockneter Pansenbakterien 41,8% und getrockneter Infusorien 26,5%. Untersuchungen über den nutritiven Wert dieses Mikrobenproteins stellten McNAUGHT et al. (1954) in Fütterungsversuchen mit Ratten an. Die Autoren geben für das Protein von getrockneten Pansenbakterien und -protozoen die biologische Wertigkeit mit 81 bzw. 80 an, die Verdaulichkeit mit 74 bzw. 91%

Von typischen Pansenbewohnern spricht man im Gegensatz zu den sich nur gelegentlich, meist vermehrt nach der Fütterung, im Vormagen befindlichen Arten. Grundsätzlich muß man hier zwischen der Pansenbakterienflora und der Pansenprotozoenfauna unterscheiden. Nach MANGOLD (1929) bzw. ORTH und KAUFMANN (1961) können bis zu 10% des gesamten Panseninhaltes aus Bakterien bestehen.

Morphologisch lassen sich von den hauptsächlich vorkommenden gramnegativen Kokken und Stäbchen die weniger häufig vertretenen Sarcinen, Spirillen, grampositive Kokken und Stäbchen unterscheiden. In physiologischer Hinsicht kann man von den Cellulolyten die Amylolyten und Proteolyten trennen. Andere Gruppen produzieren Fermente, die Pektine, Zucker, Bernsteinsäure und Milchsäure spalten oder Methan bilden. Die biologische Hauptaufgabe der Bakterien liegt zweifelsfrei erstens in der Aufschließung der für die Wiederkäuer selbst unverdaulichen Cellulose durch Bildung von Cellulase und zweitens in der Fähigkeit, Eiweißkörper aus anorganischen Stickstoffverbindungen aufzubauen. BRÜGGEMANN und GIESECKE (1966) haben einige Ansprüche und Aktivitäten von Pansenbakterien im Stickstoffstoffwechsel zusammengestellt (s. Tabelle 1, S. 8). Danach sind Ammoniumsalze für eine Anzahl der funktionell wichtigen Pansenbakterien essentiell, andere benötigen Amino-N oder werden davon stimuliert. Am Abbau der organischen Stickstoffverbindungen sind verschiedene Bakterienspecies beteiligt.

Im Jahre 1843 wiesen GRUBY und DELAFOND zum ersten Mal auf die im Vormagen der Wiederkäuer vorkommende artenreiche Infusorienfauna hin (zit. nach EBERLEIN 1895). Bis heute sind 161 Arten von Ciliaten im Wiederkäuermagen nachgewiesen worden, doch ist nach MANGOLD (1943) dieser Artenreichtum noch nicht erschöpft. Manche dieser Arten scheinen für den jeweiligen Wirtsorganismus spezifisch zu sein. Beim Rind kommen mehr

Tabelle 1: Einige Ansprüche und Aktivitäten von Pansenbakterien im Stickstoffwechsel nach BRÜGGEMANN und GIESECKE (1966)

Species	Wachstumswirkung von		Abbau von	
	NH ₄ ⁺	Amino-N ^{*)}	Protein ^{**)}	Amino- säuren
Bacteroides succinogenes	E	S-	<u>+</u>	-
Ruminococcus flavefaciens	E	-	-	-
Ruminococcus albus	E	-	<u>+</u>	-
Butyrivibrio fibrisolvens	E-	ES	<u>+</u>	<u>+</u>
Eubacterium ruminantium	E	S	-	-
Bacteroides ruminicola	S-	E-	<u>+</u>	<u>+</u>
Bacteroides amylophilus	E	?	<u>+</u>	?
Streptococcus bovis	-	S	-	-
Lactobacillus sp.	I	S	-	-
Selenomonas ruminantium	-	S	<u>+</u>	<u>+</u>
Succinivibrio dextrinosolvens	S	E	-	-
Peptostreptococcus elsdenii	-	E	-	+
Propionibacterium acnes	-	?	+	-

^{*)} Caseinhydrolysat

^{**)} Gelatine oder Casein

E = essentiell

S = stimulierend

I = hemmend

+ = angegriffen

+ = angegriffen durch
einige Stämme

E- = essentiell oder nicht essentiell

ES = essentiell oder stimulierend

S- = stimulierend oder nicht stimulierend

+ = angegriffen durch die meisten Stämme

- = nicht benötigt bzw. nicht angegriffen

oder weniger regelmäßig nur Vertreter der Gattungen Bütschlia, Dasytricha, Isotricha, Diploninium, Entodinium und Ophryoscolex vor (MANGOLD 1929; BEYRLE 1956). Der Protozoenanteil am gesamten Panseninhalt wird in der Literatur mit 5 - 10% angegeben (FERBER 1928; WINOGRADOWA-FEDEROWA 1929; HÖLLER und HARMEYER 1964). Nach Versuchen an defaunierten Schafen (MANGOLD 1950) scheinen die Ciliaten im Gegensatz zu den Bakterien für den Wiederkäuer nicht lebensnotwendig zu sein. ROLLE et al. (1956) vertreten indessen die Auffassung, daß die Infusorien bei Weidegang auf trockenen Wiesen, nicht aber bei eiweißreicher Fütterung für den Wiederkäuer lebensnotwendig sind. Auch FERBER (1928) sieht einen Zusammenhang zwischen der Infusorienzahl und dem Eiweißbedarf des Tieres.

Ein sicherer Nutzen der Protozoen liegt neben der mechanischen Unterstützung der Rohfaseraufschließung durch ihre lebhaften Schwimmbewegungen in der Veredelung pflanzlichen Eiweißes in tierisches Protein. Sie sind nicht nur an der hydrolytischen Zersetzung von Stärke und Hemicellulose, sondern auch am Abbau von Proteinen beteiligt, aber nicht zur Bildung von Cellulase und Desaminase befähigt. Die Infusorien decken ihren Stickstoffbedarf hauptsächlich durch die Aufnahme von pflanzlichem Eiweiß und von Bakterienzellen (OXFORD 1955). Das dabei gebildete arteigene Eiweiß gilt als biologisch hochwertiger als das vom Wiederkäuer aufgenommene Nahrungsprotein. Da die Protozoen genau wie die Bakterien im Darm des Wirtstieres weitgehend verdaut werden, dienen sie dem Wirtstier als Eiweißquelle. In Anbetracht der vorhergenannten Beteiligung der Protozoen am Gesamtstickstoff des Pansens muß ihr Beitrag zum Proteinhaushalt des Wiederkäuers beachtlich sein.

Die Proportionen der im Pansen vorhandenen Arten und Gruppen von Bakterien und Protozoen sind nicht konstant, sondern wechseln mit der Nährstoffzusammensetzung (HUNGATE 1966). So konnten ORTH und KAUFMANN (1961) zeigen, daß bei stärkereicher Fütterung der Ammoniakgehalt im Pansen niedriger und die Keimzahl höher sind als bei rohfasereicher Nahrung. Auch wenn man Sojaschrot durch Harnstoffbeifutter ersetzt, macht sich eine deutliche Änderung in den Proportionen verschiedener funktioneller Bakteriengruppen bemerkbar (BRÜGGEMANN et al. 1962). Eingehende Untersuchungen über die Häufigkeit der einzelnen Infusorienarten beim erwachsenen Rind in Abhängigkeit von verschiedener Fütterung hat BEYRLE (1956) angestellt. Es konnte eine Schwankung der prozentualen Anteile der Infusorien in Abhängigkeit von der Jahreszeit und dem Ernährungszustand des Wirtstieres festgestellt werden.

Es mag naheliegend erscheinen, daß Veränderungen in der mikrobiellen Population, wie sie im vorangehenden Abschnitt aufgezeigt wurden, auch die Qualität des von den Mikroorganismen gebildeten Proteins beeinflussen. Auf solche Zusammenhänge weisen Beobachtungen von ORTH und KAUFMANN (1961) hin, die in Versuchen an Milchkühen bei stärkereicher Fütterung eine größere Anreicherung der Aminosäuren Methionin und Lysin im Panseninhalt feststellen konnten als bei Verabreichung einer rohfaserreichen Diät. Allgemein gilt heute das quantitative Aminosäurenmuster als wichtiger Bewertungsmaßstab für die Qualität eines Proteins. In Hinblick auf die mikrobielle Synthese im Pansen ist es daher von Bedeutung, Art und Menge der in den Pansenmikroorganismen vorhandenen Aminosäuren zu kennen. Diesbezügliche Untersuchungen wurden von WELLER et al. (1957) an Schafen durchgeführt, die entweder auf der Weide gehalten wurden oder Diäten mit unterschiedlichem Stickstoffgehalt - einschließlich der Beifütterung von Harnstoff - erhielten. Die Hydrolysate der Bakterien- und der Protozoenzellmassen wurden nach MOORE und STEIN (1948; 1951) an Ionenaustauschersäulen untersucht (DOWEX 50 x 8; 100 cm bzw. 15 cm Harzhöhe; Fraktionsteiler). Nach den Ergebnissen dieser Studie scheint die Aminosäurezusammensetzung der bakteriellen Proteine für eine weite Reihe von Diäten annähernd konstant zu sein. Bei einem Vergleich mit der Aminosäurenverteilung in verschiedenen Grasproteinen (LUGG 1949; KEMBLE und McPHERSON 1954) kommt WELLER zu dem Schluß, daß das Aminosäurenmuster dieser pflanzlichen Proteine durch Umwandlung in Bakterieneiweiß qualitativ nicht verbessert wurde. Die Hydrolysate der Protozoeneiweiße erwiesen sich indessen als weniger einheitlich. Im Gegensatz zu den Bakterien wurden außerdem auffallend höhere Werte für Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und besonders Lysin gefunden.

Eine vollständige und quantitative Bestimmung des Aminosäurenmusters, wie sie für die zuvor besprochenen Qualitätsuntersuchungen von Proteinen erforderlich ist, bedingt einen erheblichen Arbeitsaufwand. Solche serienmäßigen Analysen lassen sich in der Laboratoriumspraxis nur mit Hilfe eines weitgehend automatisierten Verfahrens bewältigen. Die quantitative Bestimmung eines Aminosäurengemisches ist deshalb schwierig, weil die funktionellen Gruppen bei den einzelnen Aminosäuren die gleichen sind: Amino- und Carboxylgruppen.

Möglichkeiten der Identifizierung und der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren

Einzelne Aminosäuren, z. B. Histidin, Tyrosin, Glycin, Prolin, Oxyprolin, können aufgrund spezifischer Farbbildungen mit verschiedenen Reagentien identifiziert werden. Die Farbreaktionen können unter gewissen Voraussetzungen zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren durch Extinktionsmessungen herangezogen werden (z. B. POPE und STEVENS 1939; MOORE und STEIN 1948).

Allgemein sind bei den chemischen, quantitativen Bestimmungen der Aminosäuren zwei Methoden möglich: 1. Messungen aufgrund von Reaktionen der freien Aminogruppe (z. B. VAN SLYKE et al. 1911/1912; MOORE und STEIN 1948). 2. Messungen aufgrund von Reaktionen der Carboxylgruppe (z. B. SÖRENSEN 1907; WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ 1921; VAN SLYKE et al. 1941).

Von Bedeutung ist noch die mikrobiologische Bestimmung von Aminosäuren, bei der aus dem Wachstum von Bakterien (*Lactobacillus arabinosus*, *Streptococcus faecalis*, *Leucostoc mesenteroides*) auf die Menge einer zugeführten Aminosäure geschlossen wird (KOHL 1954). In der letzten Zeit wurden neue mikrobiologische Methoden vor allem zur Bestimmung der Verfügbarkeit (Verwertbarkeit) von Aminosäuren erarbeitet (FORD 1960; 1962; 1964).

Möglichkeiten zur Trennung eines Aminosäurengemisches

Die ältesten Methoden beschränken sich auf eine Zerlegung innerhalb der sauren, neutralen und basischen Aminosäuregruppen in einzelne Aminosäuren (z. B. KOSSEL und KUTSCHER 1900; FISCHER 1901; CONSDEN et al. 1947/1948). Seit 1940 sind in der Proteinchemie Verfahren entwickelt worden, mit denen ausgezeichnete Trennungsergebnisse aller Aminosäuren erreicht werden: die Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie und die Säulenchromatographie. Die Papierchromatographie (CONSDEN et al. 1944) und in letzter Zeit die Dünnschichtchromatographie (STAHL 1962) finden in den verschiedenen Modifikationen bei der Identifizierung und qualitativen Auftrennung verschiedenster Gemische in der klinischen

Diagnostik verbreitete Anwendung. Die ersten Erfolge zur Trennung von Aminosäuren mit Hilfe des säulenchromatographischen Verfahrens konnten 1941 GORDON und MARTIN verzeichnen. Ihnen gelang die Auftrennung acetylierter Aminosäuren in Adsorptionssäulen. Unter Benutzung von Stärkesäulen konnte SYNGE (1944) die vorherige Acetylierung der Aminosäuren umgehen. MOORE und STEIN (1948) stellten ebenfalls Untersuchungen an Stärkesäulen zur Trennung von Aminosäurengemischen an. Die adsorptionschromatographische Trennung an Stärkesäulen hatte jedoch den Nachteil, daß die Stärke peinlichst präpariert und nach jedem Versuch erneuert werden mußte. In Anlehnung an die Arbeiten von BLOCK (1949), ENGLIS und FIESS (1944) sowie PARTRIDGE (1949; 1950; 1951) gelang es schließlich MOORE und STEIN (1951; 1954) mit Hilfe von Ionenaustauscherharzen vom Typ DOWEX 50 x 4 diese Schwierigkeiten zu umgehen und mit ihren weiteren Untersuchungen die Grundlagen für die heute gebräuchlichen "Aminosäure-Apparaturen" mit Ionenaustauschern zu legen. Besonders verdient haben sie sich durch ihre Arbeiten über Austauscher und die Pufferlösungen gemacht.

Um die inzwischen hohe Perfektion der Aminosäure-Analytik zu erreichen, war es nötig, die drei Grundelemente dieser Analytik,

Ionenaustausch,
Ninhydrinreaktion und
kontinuierliche, colorimetrische Meßmethode,

bis in alle Einzelheiten zu erforschen und zu einer sinnvollen Einheit zu kombinieren. Die einzelnen Elemente sollen hier zum besseren Verständnis des Gesamtproblems kurz betrachtet werden.

Ionenaustauscher

Im Jahre 1850 berichteten THOMPSON und WAY, daß Ackerboden die Fähigkeit besitzt, Ammoniumionen gegen Calcium- oder Magnesiumionen auszutauschen. HENNEBERG und STROHMANN (1858) konnten diese als Basenaustausch bezeichnete Erscheinung als reversiblen und stöchiometrisch ablaufenden chemischen Vorgang erklären. Nachdem LEMBERG (1870; 1876) gezeigt hatte, daß eine ganze Reihe natürlicher Mineralien (Zoelite) zum Ionenaustausch befähigt sind, gelang es GANS (1905; 1909), anorganische Ionenaustauscher auf synthetischem Wege herzustellen. Die wichtigste Entdeckung in der Geschichte der Ionenaustauscher machten ADAMS

und HOLMES (1934 - 1938), als sie die ionenaustauschende Eigenschaft der Kunstharze erkannten. Die zunächst durch Polykondensation gewonnenen Ionenaustauscher wurden durch Polymerisationsprodukte abgelöst, nachdem es D'ALELIO (1945) gelungen war, in ein vernetztes Polystyrolharz Sulfonsäuregruppen einzubauen. Durch die Arbeiten von SAMUELSON (1953) fanden die Ionenaustauscher in der analytischen Chemie Verbreitung. GRIESS-BACH regte 1939 an, Kunstharzionenaustauscher bei der Chromatographie zu verwenden.

Ionenaustauscher sind feste, unlösliche, hochmolekulare Polyelektrolyte, die ihre gebundenen Ionen gegen Ionen gleicher Ladung aus dem umgebenden Medium austauschen können. Der dadurch zustande kommende Ionenaustausch ist reversibel und verläuft stöchiometrisch. Die sogenannten Kationenaustauscher enthalten saure Gruppen (Sulfosäure-, Carboxyl- oder Phenolgruppen) und die Anionenaustauscher enthalten basische Gruppen ($-\text{NH}_2$ -Gruppen). Als Matrix eines Ionenaustauschers bezeichnet man das hochmolekulare Gerüst aus netzartig verflochtenen Kohlenstoffketten, an dem die als Festionen bezeichneten Ankergruppen fest und chemisch gebunden sind. Die heteropolar gebundenen, austauschbaren Ionen heißen Gegenionen. Die Ankergruppen sind schwache oder starke Säuren bzw. schwache oder starke Basen, d. h. die Dissoziation und somit das Eintauschvermögen von Gegenionen ist stark pH-abhängig.

Damit die Ionenaustauschvorgänge ablaufen können, bedarf es eines vermittelnden Agens, im allgemeinen Wasser, in dem die zum Austausch kommenden Ionen gelöst sind. Der Austauscher enthält in seinen Poren Wasser, so daß im gleichen Augenblick, in dem der Austauschvorgang eingeleitet wird, die gelösten Ionen in die Poren eindringen und mit den vorhandenen Gegenionen den Platz tauschen. Die Geschwindigkeit des Ionenaustausches wird einmal durch den Radius und die Ladung der Ionen bestimmt, zum anderen durch die Korngröße und die Einheitlichkeit des Austauschermaterials.

Das Säulenverfahren ist das wichtigste und im Laboratorium am meisten angewendete Ionenaustauschverfahren. Die Austauschersäule, meist eine einfache Glasröhre, wird mit dem Ionenaustauscher gefüllt, der vorher etwa zwei Stunden im Elutionsmittel quellen soll, um ein Zersprengen der Säule zu verhindern. Für die Austauschvorgänge bei gewünschten hohen oder niedrigen Temperaturen umgibt man die Säule mit einem Temperiermantel.

Wird auf die Säulenpackung das auszutauschende Ion aufgetragen, so wird es vom Austauscher zunächst festgehalten, indem das Ion mit dem Gegenion ausgetauscht wird. Während der Elution werden die gebundenen Ionen wieder frei und wandern mit dem Elutionsmittel in der Säule nach unten. Beim Durchlaufen kommen die Ionen mit immer neuen Ionenaustauscherteilchen in Wechselwirkung, d. h. die sogenannte Austauscherzone wandert langsam nach unten. Sind die Ionen am unteren Ende der Säule angelangt, so treten sie mit dem Eluat aus der Säule aus. Durchlaufen verschiedene Ionen die Säule, so werden durch die sich immer wiederholenden Austauschvorgänge geringste Unterschiede in ihren Affinitäten zum Austauscher so verstärkt, daß eine wirkungsvolle Auftrennung des Ionengemisches erfolgt.

Zur Elution der verschiedenen Ionen wird ein bestimmtes Volumen an Elutionsmittel gebraucht. Das Hauptproblem einer ionenaustauschchromatographischen Trennung ist es, die Bedingungen zu finden, unter denen das Verhältnis der einzelnen Elutionsvolumina einen brauchbaren Wert ergibt. Die Trennung ist umso besser, je kleiner die Korngröße ist. Bei gleichbleibender Durchflußgeschwindigkeit des Elutionsmittels bedingen aber kleinere Harzkörner eine wesentliche Zunahme des Drucks in der Säule. Aus diesem Grunde muß hierzu der jeweils günstigste Mittelweg gesucht werden. Zur Herstellung einheitlicher Korngrößen ist besonders das Schlammverfahren geeignet (SCHWERDTFEGER 1961).

Das Harz wird im allgemeinen nach der Zusammensetzung der aufzutrennenden Lösung und nach der Selektivität des Austauschers den entsprechenden Ionen gegenüber ausgewählt (kugelförmige Polymerisationsharze, granulierten Polykondensationsharze, Kationenaustauscher in der H- oder Na-Form, Anionenaustauscher in der OH- oder Cl-Form). Die Vernetzung der Harze ist eine Brückenbildung zwischen den Benzolringen paralleler Kohlenwasserstoffketten mit Divinylbenzol. Es bestehen enge Beziehungen zwischen Vernetzung, Löslichkeit, Quellung, Kapazität und Selektivität des Harzes.

Die Trennung eines Aminosäurengemisches mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie

(Als erklärendes Beispiel soll hier der Ionenaustausch an dem von uns verwendeten Kationenaustauscher AMBERLITE IR-120 angeführt werden.)

Durch eine komplizierte Analysentechnik konnten die äußerst geringen Unterschiede in der Dissoziation der Amino- und Carboxylgruppen bei den einzelnen Aminosäuren zu einer ausreichenden Trennung genutzt werden. Nach dem Verhalten ihrer funktionellen Gruppen teilt man die Aminosäuren ein in saure (Aminodicarbonsäuren, Oxy- und Thioaminosäuren), in neutrale (Monoaminosäuren, aromatische Aminosäuren) und basische (Diaminosäuren) Aminosäuren. Das Festhalten der einzelnen Aminosäure am Austauscher wird durch die Dissoziationskonstante ihrer funktionellen Gruppen bestimmt. Die Dissoziation hängt vom pH-Wert des umgebenden Milieus ab. So dissoziiert z. B. eine saure Aminosäure bei einem bestimmten pH-Wert anders als eine neutrale oder basische Aminosäure. Die locker gebundenen Aminosäuren werden mit Hilfe eines durch die Säule gepreßten Puffers eluiert (Druckelution). Durch Zugabe der stark komplexbildenden Citronensäure in den Elutionspuffer werden die geringen Unterschiede in den Affinitäten der einzelnen Aminosäuren eines Austauschers noch verstärkt (Chromatographie mit Komplexbildung). Während der Analyse wird der pH-Wert des Elutionspuffers kontinuierlich geändert, um die als Schwanzbildung bezeichnete Verbreiterung der chromatographischen Zonen zu unterdrücken (Gradienten-Elutions-Chromatographie).

Im einzelnen spielen sich folgende Vorgänge ab:

Die Aminosäuren werden in Puffer pH 2,2 aufgetragen. Die Aminosäuren liegen dann in der Form $\text{R-CH}(\text{NH}_3^+)\text{COOH}$ vor. Die basische Aminogruppe hat ein H^+ -Ion aufgenommen, die Carboxylgruppe ist undissoziiert. Da die Affinität des Aminosäurekations zur Ankergruppe des Austauscher größer ist als die seines austauschbaren Na^+ -Gegenions (Salzform des Austauschers!), wird die Aminosäure zunächst fest gebunden. Die Elution beginnt mit dem Puffer pH 3,25 und wird nach dem Pufferwechsel mit dem Puffer pH 4,4 fortgesetzt. Durch die Erhöhung des pH-Wertes bedingt, dissoziiert die Carboxylgruppe ein H^+ -Ion ab und die Aminosäure geht in die Zwitterionenform $\text{R-CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ über. (Das H^+ verbindet sich mit OH^- aus dem Puffer zu H_2O .) Infolge der Elektroneutralität im Aminosäuremolekül wird jetzt dessen Kation vom Austauscher freigegeben, und die Ankergruppe wird mit dem Na^+ -Ion des Puffers wiederbesetzt. Dieser Ionenaustausch

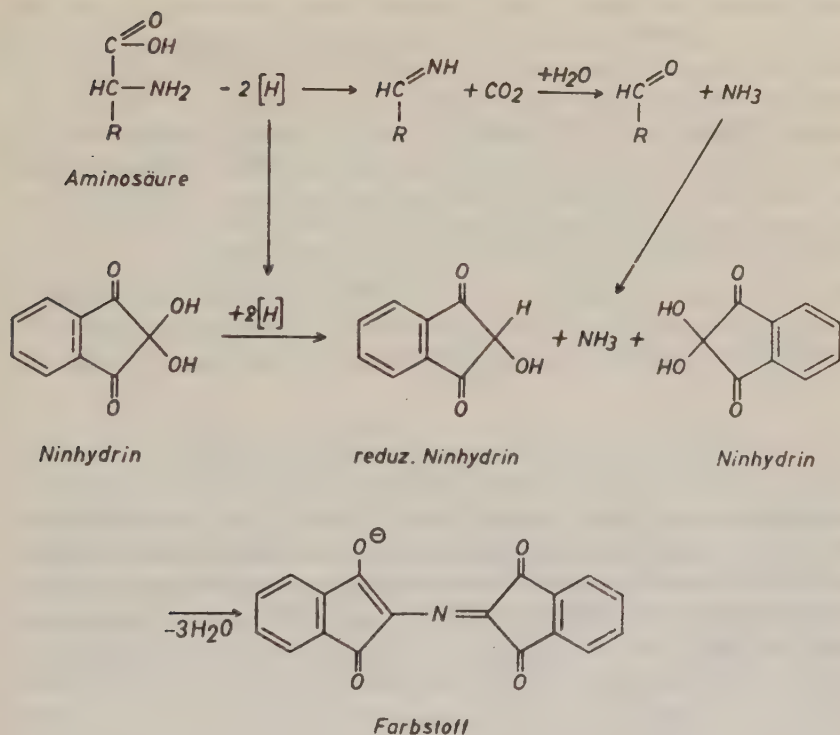
wiederholt sich in der Säule nun unendlich oft, wobei sich die geringen Unterschiede der einzelnen Aminosäuren zu einer effektvollen Trennung summieren. Schließlich treten die Aminosäurenkomponenten nacheinander im Eluat aus der Säule aus.

Die basischen Aminosäuren haben in der Säule, in der eine gute Auftrennung der sauren und neutralen Aminosäuren gelingt, einen zu großen Retentionsfaktor. Das Austreten dieser Aminosäuren wäre nur durch einen erheblichen Aufwand an Zeit und Elutionsmittel zu erzwingen. Diese Schwierigkeiten werden in der Praxis umgangen, indem man die sauren und neutralen Aminosäuren gesondert von den basischen Aminosäuren analysiert. Nach Austreten der letzten neutralen Aminosäure wird die Analyse an der großen Säule (Harzhöhe 110 bzw. 150 cm) abgebrochen. Die in der Säule verbleibenden basischen Aminosäuren werden aus der Säule durch eingepreßte Natronlauge (hohe Na^+ -Ionenkonzentration) verdrängt. Anschließend wird die Säule mit Elutionspuffer equilibriert. In einer zweiten Analyse erfolgt die Auftrennung der basischen Aminosäuren an einer kleinen Säule (15 - 20 cm Harzhöhe). Um die hohe Affinität dieser Aminosäuren zum Austauscher abzuschwächen, verwendet man zur Elution einen Puffer mit höherem pH-Wert (pH 5,3) und einer größeren Na^+ -Ionenkonzentration (0,35 n statt 0,2 n). Die sauren und neutralen Aminosäuren, deren Affinität unter diesen Bedingungen sehr klein ist, treten am Anfang der Analyse als gemeinsame Komponente im Eluat aus. Die kleine Säule braucht also nicht nach der Analyse mit Lauge regeneriert zu werden.

Ninhydrinreaktion

Bei der von RUHEMANN (1909) beschriebenen Ninhydrinreaktion (Abb. 2, S. 17) erfolgt primär eine Dehydrierung der freien α -Aminosäure zur Iminosäure und weiterhin deren Zerfall in Ammoniak, Kohlendioxid und Aldehyd. In der Sekundärreaktion verbindet sich das gebildete Ammoniak mit dem aus dem Ninhydrin entstandenen sekundären Alkohol (reduziertes Ninhydrin) und mit einem weiteren Molekül Ninhydrin zu einem blau-violetten Farbkomplex (Absorptionsmaximum bei 570 nm). Bei Prolin und Oxyprolin nimmt die Reaktion einen abweichenden Verlauf unter Bildung eines gelben Farbstoffs (Absorptionsmaximum bei 440 nm). Die Intensität des gebildeten Farbstoffs steht in direkter Proportionalität zur Konzentration der Aminosäure.

Abb. 2: Ninhydrinreaktion (KARLSON 1964)



Diese Reaktion wurde zum ersten Mal von VAN SLYKE et al. (1936; 1941) zur Bestimmung freier Aminosäuren verwendet. Das sich bildende Kohlendioxyd wurde zur manometrischen bzw. acidimetrischen Messung herangezogen. Indem MOORE und STEIN (1948) den Farbstoff zu Extinktionsmessungen benutzten, gelang es ihnen, eine äußerst zuverlässige, photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren zu entwickeln. Ein weiteres Verdienst von MOORE und STEIN (1954) war die Entwicklung eines Ninhydrinreagenzes zur kontinuierlichen Aminosäurenbestimmung.

Damit die Ninhydrinreaktion quantitativ abläuft, muß in dem Reagenz ein bestimmter Teil des Ninhydrins in reduzierter Form vorliegen. In den ersten Versuchen wurde Hydrindantin (= reduziertes Ninhydrin) dem Reagenz zugegeben (MOORE und STEIN 1954). Teilweise wurde auch durch Zugabe von Ascorbinsäure das Ninhydrin in die reduzierte Form übergeführt (TROLL 1953). Die Empfindlichkeit der Reaktion konnte wesentlich gesteigert und stabilisiert werden durch Verwendung des reduktionsfähigeren Zinn-II-chlorids (MOORE und STEIN 1948; SPACKMAN, STEIN, MOORE 1958). Ein Gemisch aus drei Teilen peroxydfreier Methylcellosolve (Methylglycol) und einem Teil starkpufferndem Acetatpuffer dient dem Ninhydrin und seinem reduzierten Anteil als Trägermedium.

Die Farbentwicklung erfolgt nach TROLL (1953) in Gegenwart von überschüssigem Ninhydrin quantitativ innerhalb von zwanzig Minuten bei $+ 100^{\circ}\text{C}$. Der optimale pH-Bereich für diese Reaktion liegt bei 5,0.

Grundlagen der colorimetrischen Meßmethode

Monochromatisches Licht, das einen absorbierenden, homogenen Körper durchdringt, erfährt eine Intensitätsabnahme dI in jeder Schicht der Dicke dx um einen konstanten Bruchteil seiner anfänglichen Intensität I_0 . Die Intensitätsabnahme ist der Intensität I_0 und der Schichtdicke dx proportional. Es gilt:

$$(1) \quad - \frac{dI}{I_0} = a \cdot dx;$$

Durch Integration über die endliche Schichtdicke x :

$$(2) \quad - \ln \frac{I}{I_0} = a \cdot x; \quad \text{oder} \quad I = I_0 \cdot e^{-a \cdot x};$$

Als Durchlässigkeit D bezeichnet man das Verhältnis der durchgelassenen zur eingetretenen Strahlung:

$$(3) \quad D = \frac{I}{I_0};$$

Man bevorzugt die Schreibweise in Extinktion (Absorptionsvermögen):

$$(4) \quad \text{als natürliche Extinktion:} \quad E = \ln \frac{I}{I_0} = -a \cdot x;$$

$$(5) \quad \text{als dekadische Extinktion:} \quad E = \lg \frac{I}{I_0} = -a' \cdot x;$$

wobei $a' = 0,434 a$ ist und als Extinktionskoeffizient bezeichnet wird (LAMBERT'sches Gesetz).

In Mischungen absorbierender mit nicht absorbierenden Stoffen kann der Extinktionskoeffizient proportional der Konzentration c des absorbierenden Stoffes sein (BEER'sches Gesetz):

$$(6) \quad a' = \varepsilon \cdot c; \quad \text{und} \quad E = \lg \frac{I_0}{I} = -\varepsilon \cdot c \cdot x; \quad \text{oder}$$
$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot x;$$

Hier wird ε als molarer Extinktionskoeffizient bezeichnet. Gültigkeit dieses Gesetzes ist jedoch nur zu erwarten, solange die Moleküle des absorbierenden Stoffes nicht durch Wechselwirkung miteinander (z. B. durch Verschiebung von Dissoziations- oder Polymerisationsgleichgewichten) oder mit anderen Stoffen der Mischphase (z. B. Solvation) konzentrationsabhängige Veränderungen erleiden, die auf die Lichtabsorption von Einfluß sind. In erster Linie ist das BEER'sche Gesetz ein Grenzgesetz für große Verdünnungen.

Wenn nun die Voraussetzungen zu diesen Gesetzen der Lichtabsorption im Falle der Aminosäurebestimmung erfüllt sind, kann aus dem Absorptionsvermögen der angefärbten Komponenten auf die Konzentration der einzelnen Aminosäuren geschlossen werden. Die Extinktionen können automatisch durch ein Meßinstrument aufgenommen und kontinuierlich durch einen Schreiber registriert werden.

Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wurden in unserem Falle folgende experimentelle Maßnahmen durchgeführt:

1. Monochromatisches Licht wird durch Interferenzfilter erzeugt.

2. Die bis zu einem gewissen Grade in der Mischkapillare erreichte Homogenität des Reaktionsgemisches wird noch durch thermische und durch Wandreibung entstehende Strömung in der langen Teflonspirale verbessert.
3. Gegenüber dem Absorptionsvermögen der angefärbten Aminosäuren ist das der Trägerflüssigkeit so gering, daß man von einer Mischung von absorbierenden mit nichtabsorbierenden Stoffen sprechen kann. Die geringen Absorptionsverluste der Trägerflüssigkeit werden außerdem durch Einstellen der Untergrundlinie auf 100 % Durchlässigkeit ausgeglichen.
4. Durch ein geeignetes Ninhydrinreagenz ist dafür gesorgt, daß die Farb-reaktion quantitativ abläuft. Reaktionstemperatur und -dauer sind so gewählt, daß der sich bildende Farbkomplex stabil ist. Dadurch wird eine konzentrationsabhängige Veränderung in der Küvette des Colorimeters vermieden.
5. Im Reaktionsgemisch liegen die einzelnen Aminosäurenkomponenten in sehr großer Verdünnung (z. b. maximal $1,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/ml Trägerflüssigkeit für Cysteinsäure) vor; die Ninhydrinreaktion ist jedoch sehr empfindlich. So kann z. B. Glykokoll noch in einer Verdünnung von 1 : 1000 gut nachgewiesen werden.

Testversuche ergaben, daß unter Berücksichtigung dieser Punkte das LAMBERT-BEER'sche Gesetz bis zu einer Konzentration von 25 mg Aminosäure/100 ml Hydrolysat erfüllt war.

C. METHODIK

Das Prinzip der automatischen Aminosäurenbestimmung mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 3)

Das Proteinhydrolysat (pH 2,2) wird vorsichtig auf die Oberfläche des Ionenaustauscherharzes aufgetragen und dann mit Stickstoffdruck eingepreßt. Aus den Vorratsflaschen kommen die einzelnen Elutionspuffer in getrennten Leitungen über Gasabscheider und Hahnsysteme zur Pumpe. Die Pumpe drückt den Puffer in genau dosierter Menge durch die Trennsäule. Infolge ihrer verschiedenen Affinitäten zu dem Ionenaustauscherharz durchwandern die einzelnen Aminosäuren die Säule in unterschiedlich langen Zeiten. Durch die Erhöhung des pH-Wertes des Elutionspuffers wird die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Aminosäuren verändert. Sie treten getrennt im Eluat aus. Die zum Ionenaustausch notwendige Betriebstemperatur der Säule liefert ein Wasserbad mit Umwälzpumpe. Das Ninhydrinreagenz fließt aus dem Vorratsgefäß zur Ninhydrinpumpe, die dieses Reagenz in genau dosierter Menge dem Eluat aus der Trennsäule beimischt. Das Reaktionsgemisch durchfließt eine Teflonspirale, die in ein Wasserbad mit einer konstanten Temperatur von 100°C getaucht ist. Die Länge der Teflonspirale ist so bemessen, daß die Durchlaufzeit einen quantitativen Ablauf der Ninhydrinreaktion gewährleistet. Anschließend durchläuft das Reaktionsgemisch die Küvette eines Colorimeters und gelangt zu dem hochgelegenen Auslauf. Die bei der Ninhydrinreaktion angefärbten Aminosäuren bewirken eine, ihrer Farbintensität entsprechende Absorption des durch die Küvette fallenden Lichtstrahls. Die dadurch entstehenden elektrischen Impulse der Photozelle werden auf ein Schreibgerät übertragen und auf einem Papierstreifen als Registrierchromatogramm aufgezeichnet. Durch Eichlösungen ist die Folge der einzelnen Aminosäuren im Eluat und die Relation des Flächeninhalts der Chromatogrammkurven zur jeweiligen Aminosäurenkonzentration bekannt, so daß die einzelnen Aminosäuren aus einem unbekannten Proteinhydrolysat quantitativ bestimmt werden können.

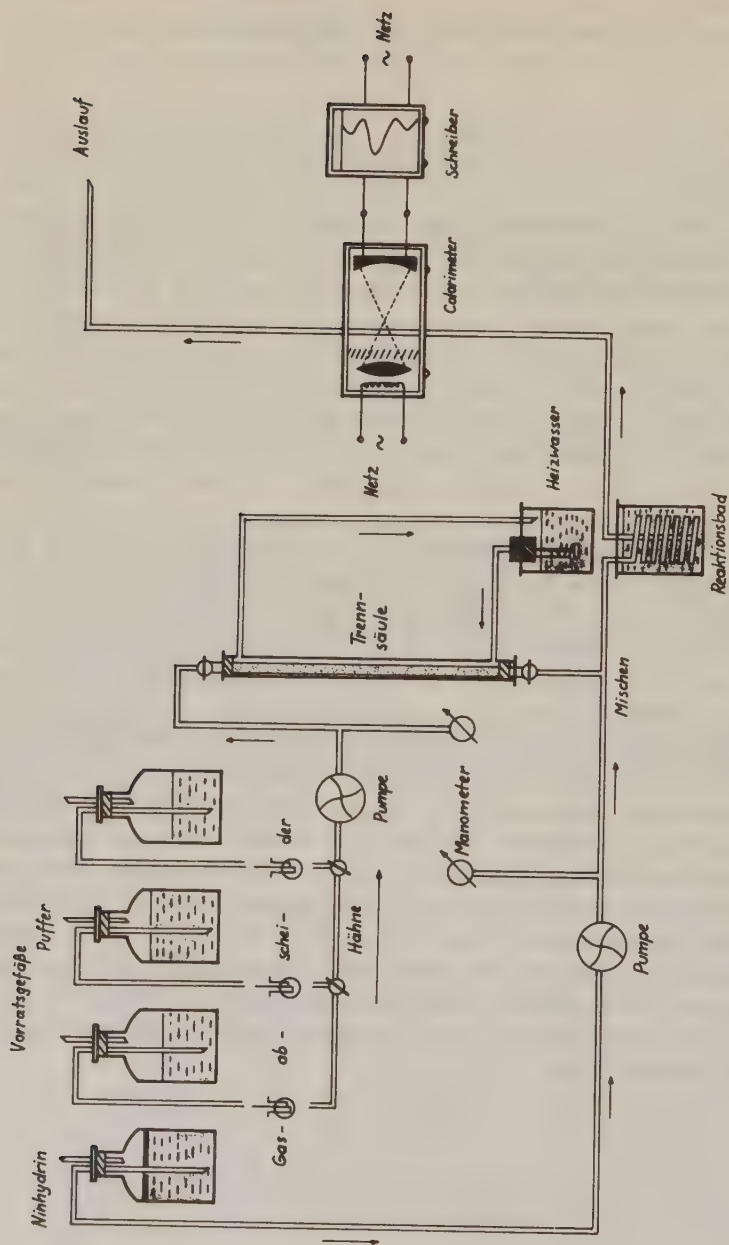


Abb. 3 : Prinzip der automatischen Aminosäurebestimmung.

Technische Geräte

Um störende Schwankungen des Stromnetzes abzufangen, ist der elektrischen Anlage ein Spannungsstabilisator⁺ vorgeschaltet. Durch Betätigung eines Hauptschalters wird die gesamte Apparatur unter Strom gesetzt; ferner kann jedes Gerät einzeln, manuell oder durch Zeituhren⁺⁺ gesteuert, ein- und ausgeschaltet werden. Der Pufferwechsel wird teilweise durch eine weitere Zeituhr geregelt.

Zur kontinuierlichen Förderung und genauen Dosierung der Elutionspuffer und des Ninhydrinreagenzes wird eine Labordosierpumpe⁺⁺⁺ verwendet.

In unserem Fall handelt es sich um eine Doppelkolbenpumpe, deren Kolben im zwangsläufigen Gegentakt mit getrennten Fördersystemen arbeiten. So kann der Puffer durch den einen und das Ninhydrinreagenz durch den anderen Kolben gefördert werden. Die Pumpenköpfe aus V4A-Stahl haben auf der Saug- und Druckseite Doppelkugelfallventile, ebenfalls aus V4A-Stahl. Auf der Druckseite ist die eine Ventilkugel durch eine Feder für einen statischen Differenzdruck von 1,6 atü gegenüber der Saugleitung belastet. Die Pumpe hat eine sehr geringe Ansaugleistung, so daß auf der Saugseite ein statischer Druck von mindestens 1 m Wassersäule gewährleistet sein muß. Der Kolbendurchmesser beträgt 3 mm. Die Hubhöhe ist auch während des Betriebes stufenlos von 0 - 15 mm einstellbar, wodurch die Fördermenge verändert werden kann. Aus dem Kolbendurchmesser und der Hubzahl - 19/Minute - läßt sich für eine bestimmte Fördermenge Q die einzustellende Hubhöhe berechnen. Diese theoretische Hubhöhe muß mit dem Faktor 1,1 multipliziert werden, um die effektive Fördermenge zu erreichen. Der Faktor wurde experimentell bestimmt.

Die Farbintensität der angefärbten Aminosäuren wird kontinuierlich von einem Colorimeter^x gemessen.

⁺ Magnetischer Spannungsstabilisator der Fa. GIESENHAGEN KG, München, Typ UMK S/1000

⁺⁺ HANHART-Start-Stop-Zeituhren

⁺⁺⁺ Labordosierpumpe der Fa. LEWA, Leonberg-Stuttgart, Typ HK 2

^x Colorimeter der Fa. BECKMAN Instruments GmbH, München, Modell C

Von der Lichtquelle, einer Spezial-Wolfram-Lampe mit Edelgasfüllung, fällt das Licht, von einer Kollimatorlinse gebündelt, durch Interferenzfilter und Küvette auf eine blauempfindliche Photozelle.

Bei einem Interferenzfilter macht man sich die Interferenzerscheinung kohärenter Wellen an planparallelen Platten zunutze, um aus einem Wellengemisch einer Glühlampe eine Welle mit einer bestimmten Wellenlänge zu selektieren. Das Interferenzfilter besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen dicken planparallelen Platten. Durch je eine Platte mit einer bestimmten Dicke kommt es zur Auslöschung einer Welle mit einer bestimmten Wellenlänge. Nur die Welle mit der gewünschten Wellenlänge kann das Filter passieren. Das Absorptionsmaximum des sich bei der Ninhydrinreaktion bildenden Farbkomplexes liegt bei 570 nm. Deshalb wurde ein Interferenzfilter mit dieser Wellenlänge (Halbwertsbreite von 8 - 10 nm) für unsere Untersuchungen gewählt.

Da das Gerät nur zu colorimetrischen Messungen an Reagenzgläsern bestimmt war, wurde in den Reagenzglashalter eine einfache Durchflußküvette aus Glasrohr mit 2 mm Innendurchmesser eingebaut. Die Küvette wurde so ausgeblendet, daß ihr Lumen auf einer Fläche von 10 x 2 mm durchleuchtet wird.

Das Schreibgerät⁺ registriert die Meßimpulse des Colorimeters automatisch durch Aufzeichnen eines Chromatogramms. Das Schreibpapier bewegt sich mit konstantem Vorschub von 60 mm/Stunde. Es zeigt in Laufrichtung eine Zeiteinteilung (Stunden) und senkrecht dazu, also in Auslenkrichtung des Schreibarmes, für die Durchlässigkeit eine Einteilung von 0 - 100%.

Die Trennsäulen (modifiziert nach SPACKMAN et al. 1958) bestehen aus dem eigentlichen Chromatographierohr aus dickwandigem Glas und dem weitleumigen Außenrohr zur Aufnahme des Heizwassers. Der Innendurchmesser des Chromatographierohres beträgt 0,9 cm. Das Rohr endet am Säulenkopf (oberes Ende) mit einer Kugelschliffschale 12/5 mm und am Säulenfuß (unteres Ende) mit einem Kugelschliffkern 12/1 mm. Kurz oberhalb dieses Kugelschliffkerns ist genau horizontal eine Glasfritte mit der Porenweite 3 nm eingeschmolzen. Zur Auftrennung der sauren und neutralen Aminosäuren dienen zwei 120 cm lange Säulen mit einer Harzhöhe von 110 cm; zur

⁺ Punktschreiber der Fa. HARTMANN/BRAUN AG, Frankfurt/Main, Typ T 192 I

Auftrennung der basischen Aminosäuren genügen zwei 20 cm lange Säulen mit einer 15 cm hohen Harzfällung. Während die eine Säule eines Paares der Analyse dient, kann die andere Säule zur nächsten Analyse vorbereitet werden.

Entfernt man nach einer Analyse die Eluatleitung von der Säule, so steigen Luftblasen durch den Kugelkern in den Raum unter der Fritte. Zwischenschalten eines S-förmig gebogenen Zusatzrohres aus einem etwa 30 cm langen Kapillarglasrohr zwischen Säulenfuß und Eluatleitung verhindert dies.

Die Kugelschliffverbindungen der aufgesetzten Leitungen wurden durch Kugelschliffklammern mit Feststellschraube gesichert; die Abdichtung erfolgte durch eingelegte Dichtungen aus Mipolam.

Während der gesamten Analysendauer werden die großen und die kleinen Säulen durch konstant temperiertes Heizwasser mit $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ beheizt. Um die störenden Schwankungen der Raumtemperatur abzufangen, fließt das Wasser sehr schnell (12 Liter/Minute)⁺ in dem weitleumigen Heizwassermantel um das Chromatographierohr. Die Lumina der Heizwasserleitungen sind entsprechend weit gewählt (12 mm).

Die in größeren Mengen hergestellten Elutionspuffer werden in 10-Liter-Vorratsgefäßen aus Jenaer Glas aufbewahrt. Die Pufferentnahme erfolgt über Steigrohre. Um die Aufnahme von Luftammoniak durch die Pufferlösungen zu verhindern, gelangt die Ausgleichsluft über ein Absorptionsrohr, gefüllt mit kristalliner Citronensäure, in die Vorratsflaschen für den Puffer pH 4,4 und 5,3.

Um das Ninhydrinreagenz gegen schädigende Einflüsse durch Wärme, Licht und Oxydation (Luftsauerstoff) zu schützen, wird es im Eisschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einer braunen Glasflasche unter Paraffinöl aufbewahrt. Auch in einem Ninhydrinreagenz bester Qualität bilden sich mit der Zeit dunkle Verunreinigungen, die das einwandfreie Ventilspiel der Pumpe und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachteilig beeinflussen können. Der Hauptteil dieser Verunreinigungen wird durch das in die Ninhydrinleitung vor der Pumpe eingesetzte Filter abgefangen. Es ist unvorteilhaft, frischzubereitetes Reagenz zu einem Rest in der Vorratsflasche zu geben. Daher werden stets zwei aus-

⁺ Der "Thermomix" der Fa. BRAUN, Melsungen, Apparatebau, ist gleichzeitig Thermostat-Heizer und Wassermwälzpumpe.

wechselbare Vorratsflaschen verwendet. Um die Aufnahme von Sauerstoff durch das überschichtete Paraffinöl zu verhindern, läßt man die in das Vorratsgefäß einströmende Ausgleichsluft durch eine mit O_2 -Absorptionsgemisch nach DOETSCH (1952) gefüllte Gaswaschflasche perlen.

Die Vorratsgefäße für Regenerierlösungen (Seite 32) sind 5-Liter-Flaschen aus dickwandigem Glas. Durch einen aufschraubbaren Bügel wird der Gummikorken festgehalten. An das kurze Druckrohr wird bei Gebrauch eine Stickstoffflasche angeschlossen. Das Steigrohr ist über einen längeren PVC-Schlauch mit einem Kugelschliffkern verbunden, der beim Regenerieren auf den Säulenkopf aufgesetzt wird. Die Lösungen werden unter Paraffinöl aufbewahrt.

Die drei Gasabscheider, getrennt für jeden Elutionspuffer, wurden nach Angaben von SPACKMAN et al. (1958) angefertigt. Sie befinden sich in einem 1-Liter-Rundkolben mit ständig kochendem Wasser. Die Austreibung des Gases erfolgt nicht passiv durch Glaswolle oder dergleichen, sondern aktiv durch, in die Entlüftungsröhre der Gasabscheider eingesetzte, vibrierende Teflonstäbe. Dazu wird die Vibration eines kräftigen WAGNERSchen Hammers auf die Teflonstäbe durch einen sie verbindenden Bügel übertragen (s. Abb. 4).

Damit es nicht zu Fehlleistungen der Pumpe kommt, muß bei der Wahl der Zuleitungen für Puffer und Ninhydrinreagenz beachtet werden, daß die vorgeschriebene statische Zulaufhöhe (Werksangabe: 1 m Wassersäule) in jedem Falle gegeben und der Querschnitt der Zuleitungen nicht zu klein (nicht unter 2 mm) ist. Die zu fördernden Lösungen müssen durch Filter von Verunreinigungen befreit sein.

Als Pufferleitungen von den Vorratsflaschen bis zum Hahnssystem werden PVC-Schläuche von 9 mm Innendurchmesser verwendet. Damit beim Pufferwechsel die Pumpe so schnell wie möglich den neuen Puffer fördert, wird als kurze Verbindung von Hahnssystem und Ansaugstutzen der Pumpe eine gleichzeitig als Pufferfilter wirkende Glasfritte G 10 mit 3 cm Durchmesser eingesetzt.

Damit das Ninhydrinreagenz den weiten Weg vom Kühlschrank bis zur Pumpe in kurzer Zeit zurücklegt (Wärmeempfindlichkeit), dient als Zuleitung ein abgedunkelter PVC-Schlauch von 2 mm Innendurchmesser (Lichtempfindlichkeit). Um den Zulaufdruck nicht zu mindern, ist das Filter schon in das Steigrohr innerhalb der Vorratsflasche eingesetzt. Die Filtration erfolgt durch Watte, die bei jeder neuen Flaschenfüllung ersetzt wird. Glaswolle ist unge-

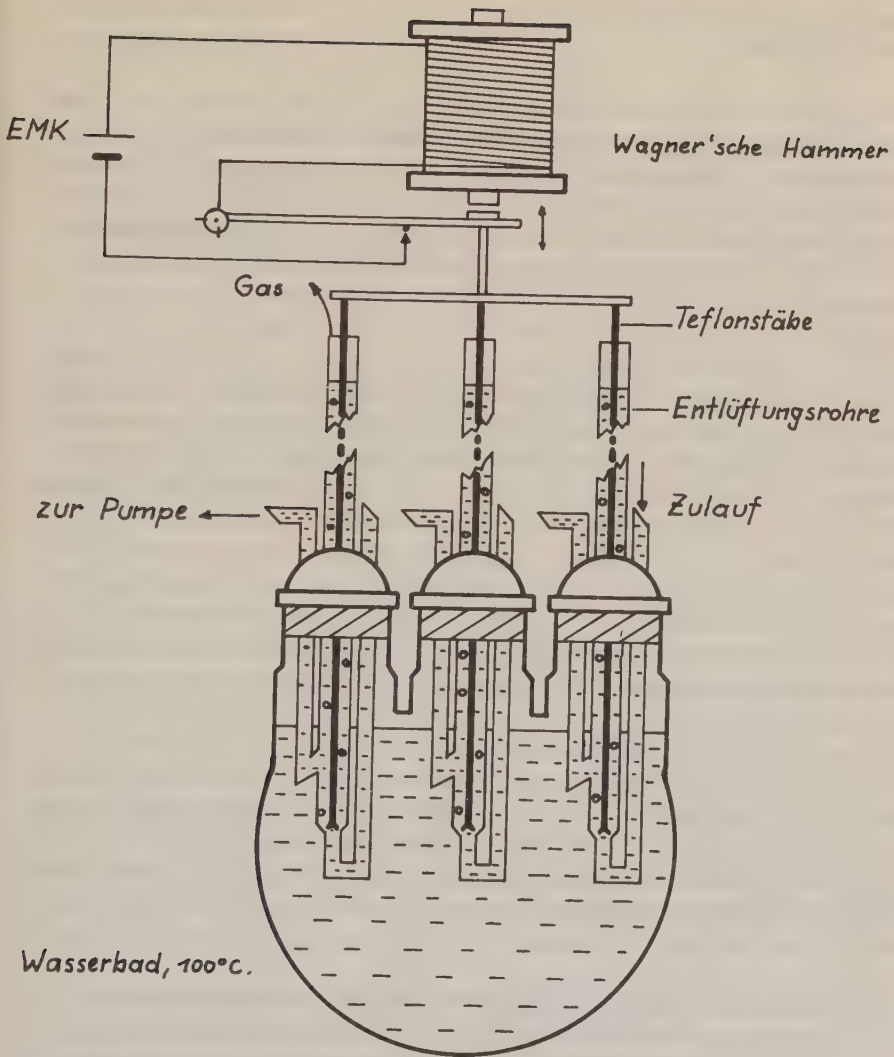


Abb. 4 : Gasabscheider

eignet, da die Härchen abbrechen und in den Pumpenkopf abgeschwemmt werden können.

Die Pufferdruckleitung besteht aus einem dickwandigen Glasrohr von 1 mm Innendurchmesser. Ein Dosenmanometer⁺ steht im Nebenschluß mit der Druckleitung in Verbindung. Der Querschnitt der Leitung wurde so klein gewählt, damit beim Pufferwechsel der zuerst geförderte Puffer sehr bald vom neuen Puffer verdrängt wird. Eine Ninhydrindruckleitung besteht praktisch nicht, da die Mischkapillare (s. unten) direkt auf den Druckstutzen der Ninhydrinpumpe aufgesetzt ist. Die Manometeranordnung gleicht der des Puffers.

Alle Verbindungen sind durch Kugelschliffe hergestellt, durch Kugelschliffklammern und Schlauchklemmen gesichert. Vom Säulenfuß bis zur Colorimeterküvette wird als Leitung Teflonspirale mit 0,9 mm Innendurchmesser verwendet. Zum Teil sind es nur ganz kleine Puffervolumina, die zwischen den einzelnen, getrennt aus der Säule austretenden Aminosäuren liegen. In einer Leitung mit sehr kleinem Querschnitt machen diese Volumina jedoch eine große Strecke aus, d. h. die Aminosäuren sind weit voneinander entfernt und werden nicht mehr nachträglich durch Turbulenzerscheinungen in der Leitung miteinander vermischt. Das glatte Teflon hat eine sehr kleine Wandreibung gegenüber der Flüssigkeit und verhindert weitere Wirbelbildungen.

Die Mischung von Eluat und Ninhydrinreagenz erfolgt passiv durch Turbulenzen in der Mischkapillare. Sie ist aus dickem Glasrohr hergestellt, dessen lichter Innendurchmesser 1 mm beträgt. Ihre drei Schenkel sind in Richtung der Raumkoordinaten angeordnet. Während zwei Schenkel der Zuführung von Eluat bzw. Ninhydrinreagenz dienen, stellt der dritte Schenkel den eigentlichen Mischteil dar. Vier eingeschmolzene Platindrühte, jeweils um 90 Grad

⁺ An der Art des Zeigerausschlages kann man u. a. das einwandfreie Spiel der Ventile beobachten. Bei vollkommener Dichtigkeit der Druckleitung erreicht der Druck zu Beginn der Analyse sehr schnell sein Maximum. Im Maximum macht dann der Zeiger bei jeder fördernden Bewegung des Pumpenkolbens eine gleichmäßige und schnelle Bewegung über einige Teilstriche. Während der Ansaugphase der Pumpe fällt der Zeiger wieder gleichmäßig, aber wesentlich langsamer (Druckausgleich durch das Harz) auf den Anfangswert zurück. Oft macht der Zeiger eine doppelschlägige Bewegung, was auf das nicht synchrone Ventilspiel zurückzuführen ist.

gegeneinander gedreht, sorgen durch Turbulenzbildung für eine genügende Durchmischung.

Das in der Mischkapillare entstehende Reaktionsgemisch durchläuft eine in ein konstant kochendes Wasserbad getauchte, 50 m lange Teflonspirale (Reaktionsbad) und gelangt dann über die Colorimeterküvette zu dem hochgelegenen Auslauf. Durch ein Abtropfen des Reaktionsgemisches entstehende, störende Schwingungen der Flüssigkeitssäule in der Küvette werden durch eine besondere Konstruktion des Auslaufs (Überlaufwirkung) vermieden.

Die einzelnen Geräte sind in einem schrankähnlichen Kasten von 135 cm Höhe, 100 cm Breite und 50 cm Tiefe untergebracht (Abbildung 5 und 6). Ein stabiler Winkeleisenrahmen ist mit Preßholzplatten verkleidet. Diese Platten dienen einerseits dem Schutz der Geräte gegen Luftzug und andererseits der Montage. Durch verschiedene Türen hat man Zugang zu den Geräten im Innern der Apparatur.

Reagentien

Wir verwendeten den stark sauren Kationenaustauscher AMBERLITE IR - 120 Type III⁺ in der Na-Form. Er stellt einen Polymerisations-Kunstharz-Austauscher mit großer chemischer und thermischer Beständigkeit dar. Als Grundkörper dient Styrol, das mit 8% Divinylbenzol vernetzt wurde (Polystyrol-sulfonsäureaustauscher). Die dabei geschaffene Matrix trägt die Ankergruppe $-\text{SO}_3^-$.

Die zum Eluieren der Aminosäuren aus den Trennsäulen benötigten Puffer setzen sich aus Lösungen von Citronensäure, Natronlauge und Salzsäure in

⁺ hergestellt von der Fa. ROHM and HAAS Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA; in Deutschland über das Entwicklungslabor SERVA, Heidelberg, beziehbar.

Daten: Korngröße von 0,45 - 0,60 mm Ø
Feuchtigkeit 44 - 48 %
pH-Bereich von 1 - 14
Totalkapazität, feuchtes Harz 1,9 mval/ml
zulässige Temperatur 110°C

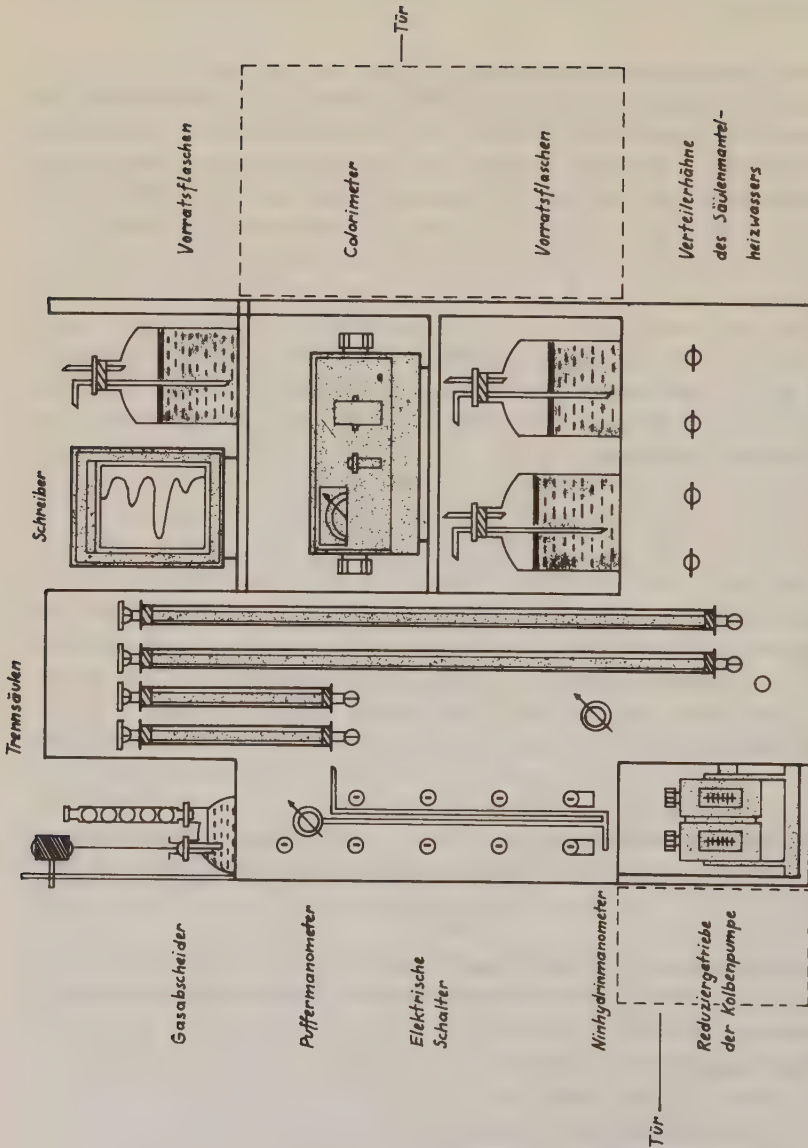


Abb. 5 : Frontansicht der Apparatur, Schema.

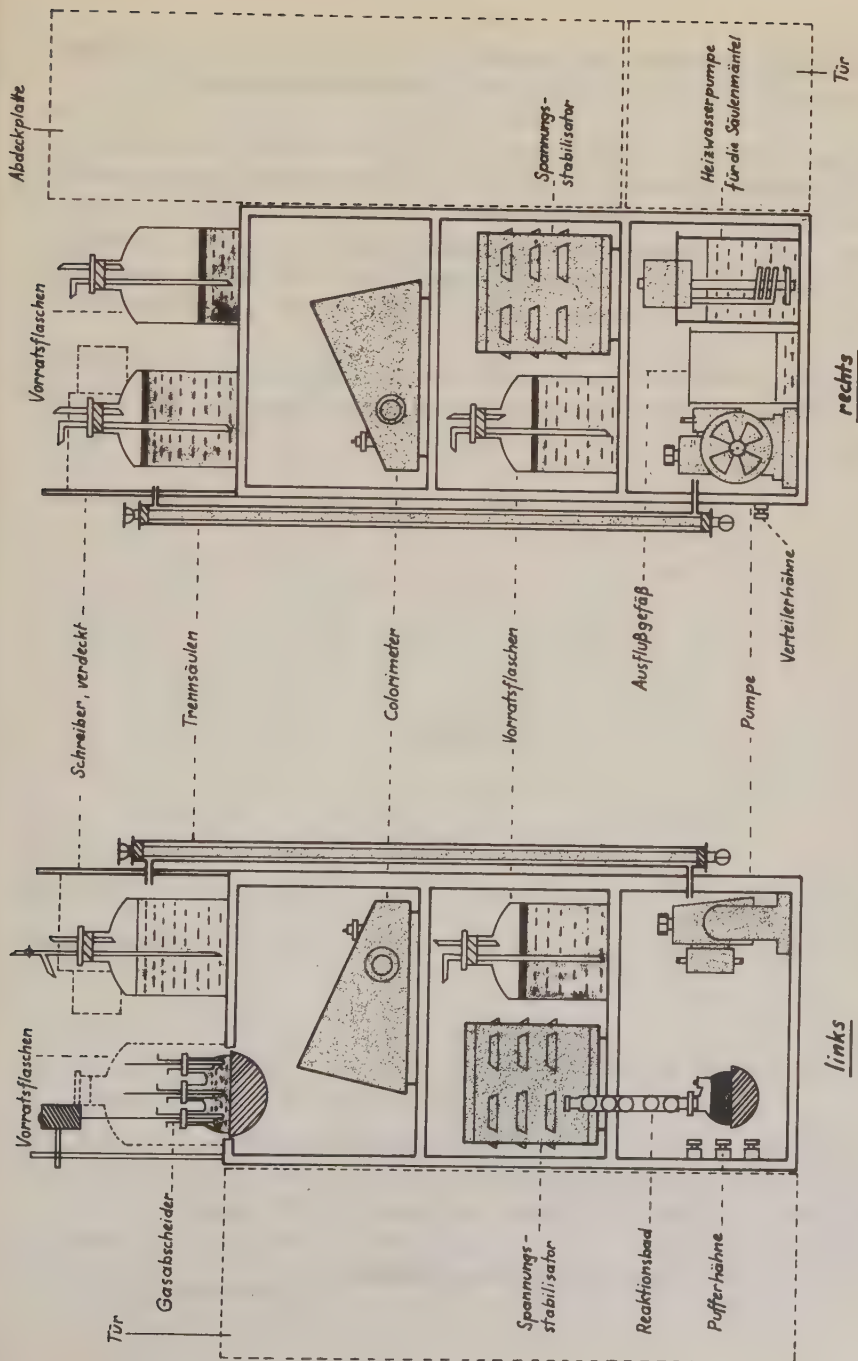


Abb. 6 : Seitenansicht der Apparatur, Schema.

Aqua bidest. zusammen. Als Netzmittel wird BRIJ-35-Lösung⁺ zugesetzt. Pilzwachstum wird durch Zugabe von n-Caprylsäure verhindert.

Bei der Herstellung des Ninhydrinreagenzes kommt neben peroxydfreier Methylcellosolve ein stark puffernder 4 n-Natriumacetatpuffer mit pH 5,51 als Trägerstoff zur Verwendung. - Nach der Analyse muß das Harz der großen Säule mit einer 0,2 n-Natronlauge regeneriert werden. Zum Equilibrieren des Harzes nach dem Regenerieren dient in der großen Säule Puffer pH 3,25. Das Proteinhydrolysat wird in Puffer pH 2,2 aufgetragen.

Die Lösungen werden in modifizierter Art nach Angaben von MOORE et al. (1958) hergestellt. Ihre Zusammensetzung ist aus folgenden Tabellen ersichtlich:

⁺ BRIJ 35 = Polyäthylenglykolmonolauryläther

Puffer⁺

pH $\pm$ 0,02		2,2	3,25	4,4	5,3	5,51
n		0,2	0,2	0,2	0,35	4,0
Citronensäure $\cdot$ H ₂ O	in g	210,0	210,0	210,0	246,0	-
NaOH	in g	82,5	82,5	82,5	144,0	-
Salzsäure 32 %	in ml	160,0	115,6	-	-	-
Salzsäure 25 %	in ml	-	-	79,5	100,0	-
Na-acetat $\cdot$ 3 H ₂ O	in g	-	-	-	-	5440,0
Eisessig	in ml	-	-	-	-	1000,0
BRIJ-Lösung ⁺⁺	in ml	20,0	20,0	20,0	20,0	-
n-Caprylsäure	in ml	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Thiodiglycol ⁺⁺⁺	in ml	200,0	-	-	-	-
Endvolumen	in Ltr.	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Laugen⁺

n		0,2	0,35
NaOH 97 %	in g	80,0	140,0
BRIJ-Lösung	in ml	20,0	20,0
Endvolumen	in Ltr.	10,0	10,0

⁺ Die Normalitäten beziehen sich auf das Natrium. Es kommen nur Substanzen von p.a.-Qualität zur Verwendung.

⁺⁺ Herstellen der BRIJ-Lösung: 50,0 g BRIJ-35 werden in 100,0 ml heißem, deionisiertem Wasser gelöst. Das BRIJ-35 bleibt bei Zimmertemperatur nicht in Lösung; die so zubereitete Lösung wird deshalb in einem Wasserbad von etwa $+50^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

⁺⁺⁺ = 2,2-Thiodiäthanol

Der Herstellung des Ninhydrinreagenzes muß besondere Beachtung geschenkt werden, da die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stark von der gleichbleibenden Güte des Reagenzes abhängt. Nicht alle auf dem Markt angebotenen Ninhydrinsubstanzen genügen den Anforderungen zur Aminosäurenbestimmung. Bei der Herstellung des Reagenzes selbst müssen schädliche Faktoren wie Licht, Wärme und oxydierende Stoffe weitgehend ferngehalten werden. Die verwendete Methylcellosolve (Methylglycol) muß peroxydfrei sein. Ninhydrin und Zinn-II-chlorid müssen genau abgewogen und in der Trägerlösung vollkommen zur Auflösung gebracht werden.

Das Ninhydrinreagenz besteht üblicherweise aus 2% Ninhydrin und 0,04% Zinn-II-Chlorid $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gelöst in einer Mischung aus drei Teilen peroxydfreier Methylcellosolve und einem Teil Natriumacetatpuffer (4 n, pH 5,51). Wir benutzten jedoch ein Ninhydrinreagenz in der von KRAMPITZ und WIENEKE (1963) angegebenen Zusammensetzung (1% Ninhydrin; 0,02% Zinn-II-chlorid $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Methylcellosolve und Acetatpuffer im Mischungsverhältnis 3 : 1) und dosierten es mit 30 ml/Stunde (Erklärung Seite 43). Die Mischung der Methylcellosolve mit dem Puffer erfolgte in der Vorratsflasche unter ständiger Stickstoffbegasung mit Hilfe eines Magnetrührers. Um die im Stickstoff immer vorhandenen Reste von Luftsauerstoff zu entfernen, wurde das Gas zuerst über einen Kupferturm geleitet. Unmittelbar nach der Herstellung ist das Ninhydrinreagenz stark mit physikalisch gelöstem Stickstoff angereichert. Wegen seiner Wärmeempfindlichkeit ist eine Gasabscheidung wie bei den Puffern nicht möglich. Um den Hauptteil des Stickstoffs zu entfernen, setzt man nach Fertigstellung und Übersichten des Reagenzes mit Paraffinöl etwa 30 Minuten lang ein Vakuum (Wasserstrahlpumpe) auf die Vorratsflasche. Während dieser Zeit bleibt der Magnetrührer in Aktion.

Analysengang

Die besten Ergebnisse werden bei einem gutausgenutzten Dauerbetrieb der Apparatur erzielt, da sich dabei mehr oder weniger stationäre Zustände einstellen. Die Beheizung der Trennsäulen sollte immer unterhalten werden, um eine Strukturverschiebung der Harzpackung durch den Temperaturwechsel zu vermeiden. Das Colorimeter muß etwa 8 Stunden vor Analysenbeginn eingeschaltet werden.

Der während des Nichtgebrauches der Säule über dem Harz stehende Puffer wird bis auf 1 mm abgesaugt und auf die Oberfläche des Harzes 2,0 ml Hydrolysat vorsichtig aufgetragen. Dabei wird ein Aufwirbeln der Harzoberfläche vermieden. Ist die Säule am unteren Ende geöffnet, so kann mit dem Einpressen des Hydrolysats durch Stickstoffdruck (große Säule 1 kg/cm^2 ; kleine Säule $0,5 \text{ kg/cm}^2$) begonnen werden. Hierbei muß man sehr vorsichtig vorgehen, der Stickstoffdruck muß abgesetzt werden, bevor die Flüssigkeit in dem Harz ganz verschwindet. Das Harz wird zwei Mal mit je 2 ml Puffer pH 2,2 nachgewaschen. Der Waschpuffer wird ebenfalls mit Stickstoff eingepreßt. Durch die Verwendung des Puffers pH 2,2 beim Auftragen des Hydrolysats wird erreicht, daß vorerst alle Aminosäuren in einer Schicht fest an den Austauscher gebunden werden (Seite 15). Anschließend füllt man die Säule mit Elutionspuffer auf und verbindet die Pufferdruckleitung unter Vermeidung von Luftblasen mit der Säule. Nach etwa einer Stunde erfolgt eine Kontrolle und eventuelle Korrektur der Basislinie. Während dieser Zeit muß die Dosierung der Pumpen überprüft werden. Sieht man von gewohnheitsmäßigen Kontrollen ab, so kann die Apparatur von jetzt an sich selbst überlassen bleiben.

Die analytische Auftrennung der basischen Aminosäuren in der kleinen Säule dauert 6 1/2 Stunden (Pufferdurchfluß 30 ml/Stunde; Harzhöhe 15 cm; Puffer pH 5,3; Säulenmanteltemperatur 50°C), die der sauren und neutralen Aminosäuren in der großen Säule 13 Stunden (Pufferdurchfluß 30 ml/Stunde; Harzhöhe 110 cm; Puffer pH 3,25 und pH 4,4; Säulenmanteltemperatur 50°C).

Das Hahnsystem, über das der gewünschte Puffer zur Pumpe fließt, besteht aus zwei hintereinander in die Pufferzuleitung eingesetzten Zweiwegehähnen. Der Pufferwechsel von pH 3,25 auf pH 4,4 und umgekehrt geschieht automatisch, geregelt über eine START-STOP-Zeituhr. In Ermangelung eines elektromagnetischen Ventils ist die Automation mit Hilfe eines kleinen abgeänderten Uhrwerkes und eines umpolbaren Elektromotors gelungen. Bei einer Harzhöhe von 110 cm erfolgt der Wechsel von pH 3,25-auf pH 4,4-Puffer genau 6 Stunden nach Analysenbeginn. Variiert bei einer Säule die Harzhöhe, so muß man den Pufferwechsel in Abhängigkeit des Differenzvolumens in der Säule und der Durchflußgeschwindigkeit des Puffers vor- bzw. nachverlegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Ist der automatische Wechsel von Puffer pH 3,25 auf pH 4,4 erfolgt, so wird der Elektromotor umgepolt und auf der Zeituhr der Zeitpunkt des voraussichtlichen Analysenendes eingestellt. Die Pumpe fördert dann wieder Puffer

pH 3,25, wodurch die Apparatur am nächsten Tag sofort mit der zweiten vorbereiteten Säule einsatzfähig ist. Das Umschalten auf den Elutionspuffer der kleinen Trennsäule (pH 5,3) geschieht von Hand.

Aus Arbeitsvereinfachung wurde auf einen Filterwechsel für die gelbgefärbte Prolinkomponente verzichtet.

Die Regeneration mit 0,2 n Natronlauge ist bei der großen Trennsäule nach jeder Analyse nötig, da die basischen Aminosäuren in der Säule verbleiben. Die kleine Säule kann zur besseren Auftrennung nach 5 - 7 Analysen mit 0,35 n Natronlauge regeneriert werden. Die Lauge wird mit etwa 1 kg/cm^2 Stickstoffdruck in die Säule gepreßt, die Hälfte des Druckes genügt bei der kleinen Säule. Die Wanderung der Lauge durch die Säule erkennt man an der etwas dunkleren Färbung des Harzes. An der Form der Trennungsgrenze (Seite 37) zwischen Puffer und Lauge ist die Güte der vorhandenen Harzfüllung festzustellen. Ist ungefähr ein Drittel des Harzes mit Lauge durchsetzt, wird diese abgesetzt und die Säule zum Equilibrieren an die Druckflasche des Regenerationspuffers angeschlossen. Die beste Auftrennung der Aminosäuren wird erst nach 2 - 3 Regenerationen erreicht. Falls eine Säule aufgrund von Verunreinigungen der oberen Harzschicht durch ungenügend gereinigte Proben nicht mehr genügend auftrennen sollte, so ist etwa 1 cm der Harzfüllung durch neues oder gereinigtes Harz zu ersetzen (besonders bei den kleinen Säulen!).

Füllen der Trennsäulen

Vor dem Einbringen der Harzpackung wird das Innenrohr der Trennsäule mit Regenerierlauge gereinigt, mit Aqua dest. und zum Schluß mit Equilibrierpuffer (Seite 32) nachgewaschen. Die Luft unter der Säulenfritte wird entfernt, indem man sehr langsam Equilibrierpuffer in die Säule hochsaugt (bis etwa 10 - 20 cm über die Fritte), wobei die Luft mitgenommen wird. Anschließend wird der Säulenfuß verschlossen und mit dem Füllen begonnen.

Aus Puffer und Harz bereitet man eine 2 : 1 Aufschlammung, die unter ständigem Umrühren bis nahe zum Siedepunkt erhitzt wird. Der Großteil der physikalisch gebundenen Luft wird auf diese Weise entfernt.

Die noch heiße Harzsuspension kommt in mehreren Portionen in die beheizte Säule. Die Anzahl der Rationen wird nach der gewünschten Harzhöhe be-

rechnet. Die Füllung der großen Säule erfolgt in 3 - 4 und die der kleinen Säule in 1 - 2 Portionen. Die erste Harzration trifft auf den in der Säule stehenden Puffer, der zur Entgasung der Fritte hochgesaugt wurde. Eine gute Sedimentation der Harzpartikel ist dadurch gewährleistet. Nachdem sich der Hauptteil des Harzes abgesetzt hat, wird der Säulenfuß geöffnet, um das restliche Absetzen zu beschleunigen und Platz für die nächste Suspensionsration zu schaffen. Diese wird jeweils zugeschüttet, wenn über dem abgesetzten Harz noch etwa 10 cm Flüssigkeit steht. Um auch die letzte Harzportion noch in die Säule zu bringen, wird auf die Trennsäule ein "Füllrohr" (Länge 80 cm; Innendurchmesser 9 mm; unteres Ende ein Kugelschliffkern 12/5 mm; oberes Ende trichterförmig erweitert) aufgesetzt. Hat sich die letzte Ration vollkommen abgesetzt, wird das "Füllrohr" entfernt und man läßt die Pumpe Pufferlösung in der vorgeschriebenen Durchflußgeschwindigkeit durch die Säule drücken. Nach dem dadurch bedingten nochmaligen Absetzen der Harzpackung wird die Harzhöhe korrigiert. Dabei ist zu beachten, daß schon eine Höhendifferenz von 1 cm eine Verschiebung der Elutionsmaxima im Chromatogramm um mehrere Minuten zur Folge hat. Zum Schluß wird die neugefüllte Säule mit Lauge regeneriert und mit entsprechendem Puffer equilibriert. Bei dieser ersten Regeneration kann schon festgestellt werden, ob die Säule richtig gefüllt ist. Die Trennfront zwischen Puffer und Lauge muß in glatten, waagerechten Zonen nach unten ziehen. Zeigen sich Zacken und Schwanzbildungen, so ist die Füllung der Säule zu wiederholen.

Aus verschiedenen Gründen (Verschmutzung des Harzes, Abreißen der Füllung, hoher Druck durch zu feine Harzpartikel, schlechte Trennung infolge zu grober Harzpartikel u. a.) ist es eventuell nötig, das Harz aus der Säule zu entfernen und neu aufzuarbeiten.

Die Aufbereitung des Harzes bei Verschmutzung wird nach HAMILTON (1958) durchgeführt.

Herstellen der Hydrolysate

In 400 ml 6n-Salzsäure wird eine etwa 100 mg Rohprotein entsprechende Menge des homogenisierten und luftgetrockneten Untersuchungsmaterials unter Stickstoff 24 Stunden lang bei Siedetemperatur der Salzsäure hydrolysiert. Das Hydrolysat wird nach Abkühlung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

200 ml dieses Hydrolysates werden im Vakuumrotationsverdampfer bei 50°C bis auf etwa 20 ml eingeeengt. Nach zweimaligem Aufnehmen in je 50 ml Aqua dest. und zweimaligem Einengen auf jeweils 20 ml wird der Rückstand mit Puffer pH 2,2 (Seite 32) auf genau 100 ml aufgefüllt und filtriert. Die so gewonnenen Proben werden bis zur Analyse (spätestens 48 Stunden nach der Hydrolyse) bei + 4°C aufbewahrt.

Um der weitgehenden Zerstörung von Cystin und Cystein bei der oben beschriebenen Hydrolyse zu entgegnen, werden diese nach Überführung in die stabilere Cysteinsäure durch Oxydation des Untersuchungsmaterials mit Perameisensäure (MOORE 1962) bestimmt. (Methionin wird dabei zu Methioninsulfon oxydiert.) Dazu läßt man eine Mischung aus 97 ml 98%iger Ameisensäure mit 3 ml Perhydrol 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, kühlt sie daraufhin innerhalb einer Stunde auf 0°C ab und fügt schließlich das Untersuchungsmaterial (s.o.) hinzu. Nach einer Reaktionszeit von 12 - 16 Stunden bei 0°C werden zur Beendigung der Oxydation 14 ml Bromwasserstoffsäure (48%ig) zugegeben und die Perameisensäure im Vakuumrotationsverdampfer bei 40°C abgedampft. Die sich anschließende Hydrolyse und die weitere Aufarbeitung des Hydrolysats erfolgt wie bei dem nicht oxydierten Material.

Zur Analyse werden von jedem Hydrolysat je 2 ml auf die Säule aufgetragen.

Eichkurven, Eichlösungen

Um aus einem Aminosäuregemisch unbekannter Zusammensetzung die einzelnen Komponenten quantitativ bestimmen zu können, müssen mit Hilfe von Aminosäureeichlösungen verschiedener Konzentration für die einzelnen Aminosäuren Eichkurven aufgestellt werden.

In Testversuchen wird die jeweilige Retentionszeit der einzelnen Aminosäure sowie ihre Position zu den anderen Aminosäuren festgestellt, so daß jede Aminosäure im Chromatogramm lokalisierbar ist. Die für jede Aminosäure aufgezeichneten Kurven gleichen einer GAUSS'schen Verteilungskurve. Der Kurveninhalt steht in direkter Proportionalität zu der Konzentration der Aminosäure. Die Berechnung würde nach dem Integral

$$\int_{t_1}^{t_2} D dt \quad \text{bzw.} \quad \int_{t_1}^{t_2} E dt$$

erfolgen, wobei t_1 = Anfangspunkt und t_2 = Endpunkt der GAUSS'schen Verteilungskurve der Aminosäure im Chromatogramm sind. Da man jedoch die mathematische Funktion der Kurven nicht kennt, muß man für die Flächenberechnung zur graphischen Integration als Näherungsverfahren greifen: die Höhe der Kurve im Durchlässigkeitsminimum wird mit der Breite der Kurve in der halben Höhe (= mittlere Halbwertsbreite) multipliziert.

Für eine Aminosäure bestimmter Konzentration bleibt bei allen Analysen das Zeitintervall $t_2 - t_1$ konstant. Das heißt, man kann zur Flächenberechnung die mittlere Halbwertsbreite (auch mittlere Elutionszeit der entsprechenden Aminosäure) in mm vom Chromatogramm ablesen. Die Höhe des Kurvenmaximums (= Durchlässigkeitsminimum) wird in Prozent der Durchlässigkeit abgelesen und kann so (oder in mm ausgedrückt) direkt zur Multiplikation der Halbwertsbreite herangezogen werden. Werden die Werte in einem Diagramm in Abhängigkeit der Konzentration eingetragen, so können die Meßwerte durch eine logarithmische Kurve verbunden werden. Rechnet man jedoch vor der Multiplikation die Durchlässigkeitswerte in die entsprechenden Extinktionen um, so ergibt sich als Verbindungslinie der Meßwerte eine Gerade (LAMBERT-BEER'sches Gesetz). Da es in jedem Falle exakter ist, eine Interpolation weniger Meßwerte durch eine Gerade durchzuführen, wurden zur Berechnung der einzelnen Verteilungskurven die Extinktionswerte herangezogen.

Die Eichlösungen enthalten die Aminosäuren in unterschiedlichen Konzentrationen in Puffer pH 2,2 (Seite 32).

Testversuche an der Apparatur

Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens: Um vergleichbare Ergebnisse der verschiedenen Analysen zu erhalten, wurde streng auf eine konstante Förderung der Pumpen und eine Stabilität des pH-Wertes der Elutionspuffer geachtet. Durch die gleichbleibende Güte des jeweiligen Ninhydrinreagenzes war eine gleichmäßige Anfärbung der Aminosäuren gewährleistet. Die die Trennung beeinflussenden Faktoren der Trennsäule (Höhe der Harzfüllung, Korngröße und Einheitlichkeit des Harzes, Säulentemperatur) wurden bei der Durchführung der Analysen nicht geändert.

Um die Reproduzierbarkeit an den großen Säulen zu prüfen, wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen das gleiche Aminosäurengemisch abwechselnd

auf beiden Trennsäulen mit gleichem Ninhydrinreagenz analysiert:

Amino- säure +	Kurveninhalt in mm ²					Mittelwert ⁺⁺⁺
Cys	892	913	840	896	960	900 $\pm$ 4,8 %
Asp	1161	1185	1121	1161	1150	1156 $\pm$ 2,0 %
Meth	705	764	720	781	764	749 $\pm$ 4,5 %
Thre	1067	995	1085	1067	1164	1079 $\pm$ 5,6 %
Ser	1120	1272	1155	1177	1267	1198 $\pm$ 4,2 %
Glu	1267	1263	1230	1304	1263	1265 $\pm$ 2,1 %
Pro	167	186	168	175	168	173 $\pm$ 4,6 %
Gly	1924	2087	1979	1911	2087	1992 $\pm$ 3,9 %
Ala	1813	1859	1950	1860	1976	1892 $\pm$ 3,6 %
Val	936	888	911	837	887	892 $\pm$ 4,1 %
DAP ⁺⁺	378	378	386	364	381	377 $\pm$ 2,2 %
Ileu	1078	1072	1056	1040	1047	1058 $\pm$ 1,5 %
Leu	1228	1203	1146	1216	1213	1201 $\pm$ 2,6 %
Tyr	650	607	653	646	608	633 $\pm$ 3,5 %
Phe	862	900	861	830	855	862 $\pm$ 3,5 %
durchschnittlicher Variationskoeffizient						$\pm$ 3,5 %

Die Reproduzierbarkeit an den kleinen Säulen wurde während der Untersuchung der Ergebnisse festgestellt. Dabei ergab sich ein mittlerer Fehler in Prozent des Mittelwertes

für Lysin von $\pm$ 3,3 %,
 für Histidin von $\pm$ 2,3 % und
 für Arginin von $\pm$ 3,0 %;

durchschnittlicher
 Variationskoeffizient $\pm$ 2,9 %

+ Abkürzungen nach KARLSON 1964

++ Diaminopimelinsäure

+++ Zum Mittelwert wird der Variationskoeffizient = mittlerer Fehler in Prozent des Mittelwertes angegeben. Dieser wurde nach

$$d = \pm \sqrt{\frac{S(\bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{berechnet.}$$

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Qualität des Ninhydrinreagenzes wurde das gleiche Aminosäurengemisch mit drei zu verschiedenen Zeiten hergestellten Chargen Ninhydrinreagenz (Seite 34) analysiert:

Charge	1	2	3	
	Kurveninhalt in mm ²			Mittelwert
Lys	838	817	810	821 $\pm$ 1,7 %
His	658	636	624	639 $\pm$ 2,7 %
NH ₃	774	784	827	795 $\pm$ 3,5 %
Arg	638	660	644	647 $\pm$ 1,8 %
durchschnittlicher Variationskoeffizient				$\pm$ 2,5 %

Die Reproduzierbarkeit der Flächenwerte an großen und kleinen Trennsäulen bei gleichem wie auch bei verschiedenem Ninhydrinreagenz unterliegt einem mittleren Fehler von $\pm$ 3 %.

Registrierchromatogramme: Die Abbildung 7 stellt das Testchromatogramm eines Aminosäurengemisches dar (5 mg jeder Aminosäure in 100 ml Puffer pH 2,2; davon 1 ml zur Analyse aufgetragen) und soll die zeitliche Folge der sauren und neutralen Aminosäuren aufzeigen. Die Reihenfolge der basischen Aminosäuren geht aus der Abbildung 8 hervor.

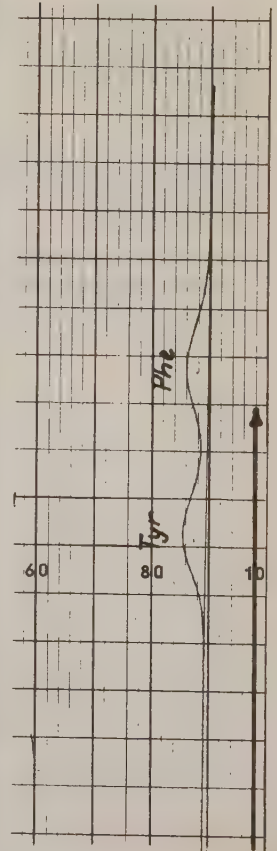
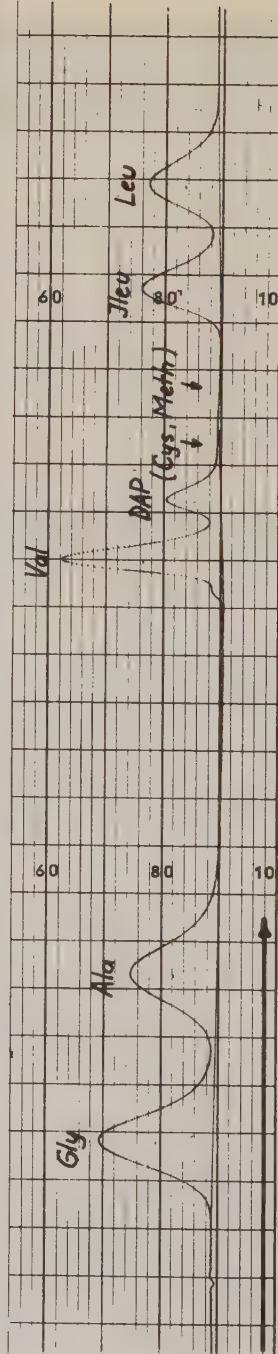
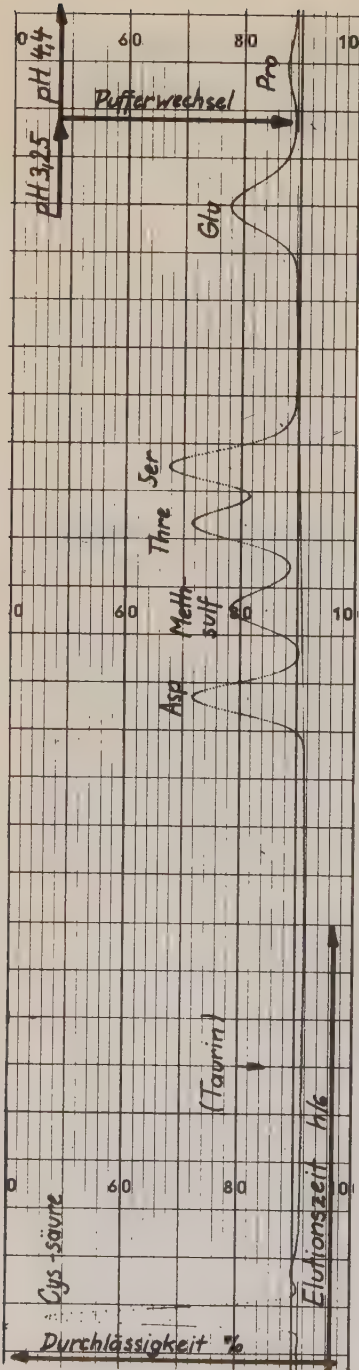


Abb. 7: Testchromatogramm
saure und neutrale Aminosäuren 5 mg %

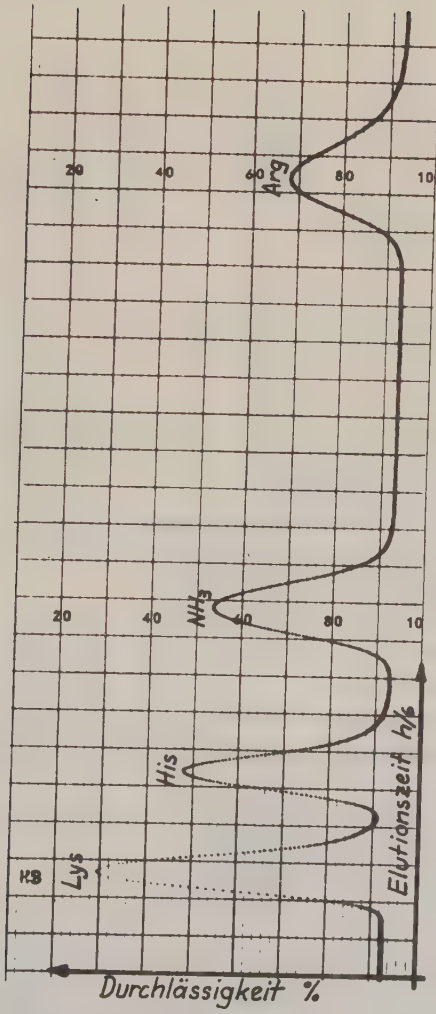


Abb. 8 : Testchromatogramm

(basische Aminosäuren)

Mangelhaftes Funktionieren von Betriebsteilen: Durch das ständige Beobachten der Kontrollgeräte an der Apparatur können das Auftreten von Fehlerquellen aufgedeckt und die entsprechenden Maßnahmen eingeleitet werden. Im Chromatogramm selbst wird das mangelhafte Funktionieren einiger Betriebsteile charakteristisch deutlich.

Ungenügende Auftrennung der Aminosäuren beruht zumeist auf einer schlechten Säulenfüllung. Eine Veränderung der Retentionszeiten der einzelnen Elutionsmaxima wird durch mangelhafte Pufferförderung, Verschiebung des pH-Wertes des Puffers oder durch eine Abweichung der Säulentemperatur verursacht. Thermische Unregelmäßigkeiten in der Apparatur bewirken eine Veränderung der Basislinie.

In Abbildung 9 sind aus Vorversuchen unter anderem aus verschiedenen Chromatogrammen charakteristische Fehlerstellen zusammengestellt:

1. Erwünschte Basislinie,
2. Das größere Absorptionsvermögen des Ninhydrinreagenzes im Vergleich zu dem Absorptionsvermögen der vorgeschriebenen Mischung von Ninhydrinreagenz mit Puffer,
3. Das Reduziergetriebe der Pufferpumpe verstellte sich selbständig um + 1 mm Hub (Augenblick der Nachregelung),
4. Temperaturschwankungen im Reaktionsbad,
5. Starker Luftzug wirkt auf die Apparatur ein,
6. Defekte Colorimeterlampe,
7. Undichte Pufferdruckleitung,
8. Temperaturschwankungen des Säulenmantel-Heizwassers,
9. Experimentell hervorgerufene, momentane Abkühlung der großen Trennsäule um etwa 2 - 4°C,
10. Versuch zur Empfindlichkeit der Apparatur bei starken Schwankungen der Raumtemperatur (siehe auch unten),
11. Unregelmäßiger Papiervorschub des Schreibgerätes,
12. Typisches "Schleppen der Kurven" bei schlechter Säulenfüllung.

In diesem Zusammenhang soll das Ergebnis eines Versuches angeführt werden, bei dem die Drucke von Puffer, Ninhydrinreagenz und der Druck im Auslauf in Abhängigkeit der Raumtemperatur festgehalten wurden. Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, blieb der Pufferdruck (kurze Leitung aus dickwandigem Kapillarglasrohr) gegenüber den Drucken von Ninhydrinreagenz und Auslauf (längere, elastische Siliconschlauchleitungen⁺) konstant.

⁺ Diese Leitungen wurden dann in entsprechender Weise abgeändert.

Abb. 9: Fehlerhafte Chromatogramm-Ausschnitte

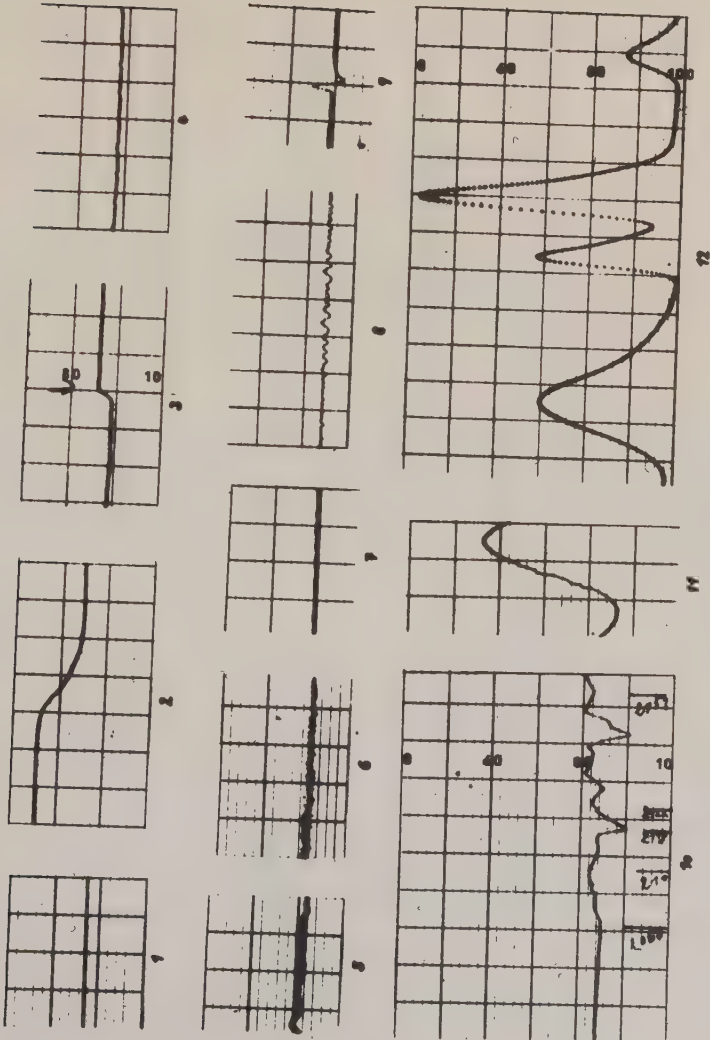
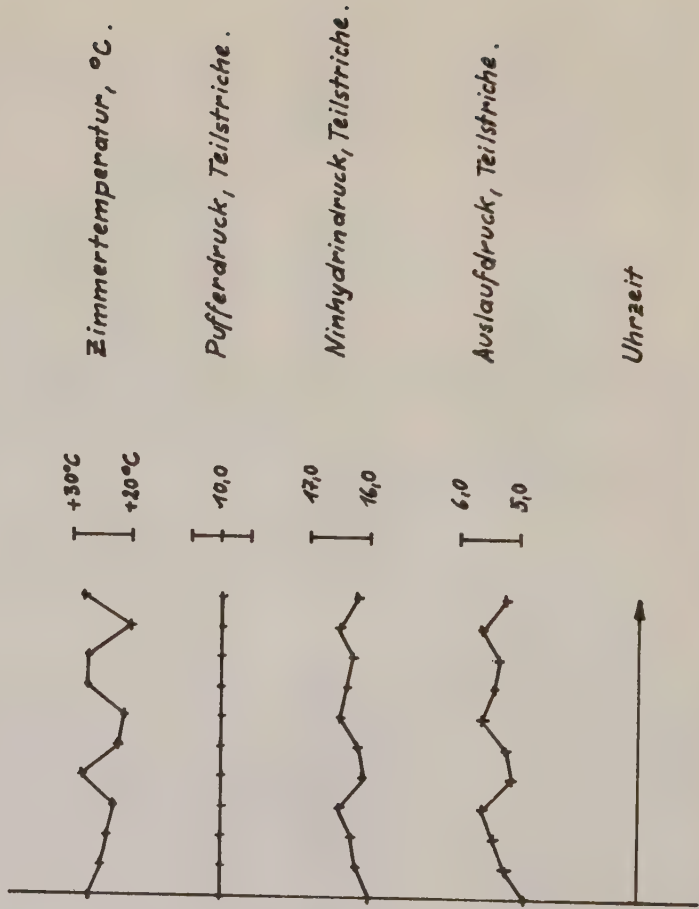


Abb. 10: Versuch zur Temperaturempfindlichkeit



Bemerkungen zur Methodik

Ursprünglich wurden in unserer Apparatur zur Förderung der Medien Spritzenaggregate verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit durch modernere Kolbenpumpen ausgetauscht wurden. Die häufig angeführten Nachteile der Aggregate gegenüber der Pumpen sind bei genauerer Betrachtung nicht so wesentlich. In leicht abgeänderter Anwendung können sie nämlich ohne weiteres in der Leistung mit Kolbenpumpen konkurrieren.

Als Nachteile der Spritzenaggregate werden genannt:

1. Durch das Volumen des Spritzenzylinders ist die zu fördernde Flüssigkeitsmenge begrenzt.
2. Der Puffer kann nicht kontinuierlich entgast werden.
3. Eine Kühlung des Ninhydrinreagenzes ist nicht möglich.
4. Beim Füllen der Spritzen kommen Ninhydrinreagenz und Puffer mit der Luft in Berührung.

Die Nachteile treffen zu, wenn die Aggregate im üblichen "Eintakt-Verfahren" eingesetzt werden. Verwendet man dagegen zur Förderung einer Lösung zwei Spritzen, die im Gegentakt arbeiten, so entfallen diese Minuspunkte. Als Vorteile können der gleichmäßige Druck und die geringe Anfälligkeit gegenüber Verschmutzung und Gasabscheidungen in den zu fördernden Medien gelten.

Bei der Förderung durch Kolbenpumpen muß man, abgesehen von einer stoßweisen Förderung, die große Anfälligkeit der beweglichen Teile (Ventile) gegen Verschmutzung und Gasabscheidung in Kauf nehmen. Außerdem wird bei so einer geringen Fördermenge pro Kolbenhub die Grenze einer präzisen Dosierung erreicht. Bei unseren Versuchen mit der Kolbendosierpumpe Type HK 2 konnten die zu Anfang bestehenden Schwierigkeiten zum Teil beseitigt werden. Mit den unter Berücksichtigung der zu fördernden, säurehaltigen Medien zunächst verwendeten Pumpenköpfen aus Teflon und Ventilkugeln aus Spezialglas war eine genaue Dosierung nie zu erreichen. Die immer wieder auftretenden Undichtigkeiten zwischen Kolbenlaufgehäuse und den aufgeschraubten Ventilkäfigen waren auf feinste Haarrisse in der Teflonoberfläche und auf die mangelhafte Präzision der Glaskugeln zurückzuführen. Durch Benutzung von Pumpenköpfen und Ventilkugeln aus V4A-Stahl konnten diese Schwierigkeiten größtenteils behoben werden. Die Sicherheit der Dosiergenauigkeit wurde durch Federbelastung einer druckseitigen Ventilkugel noch erhöht.

Schwierigkeiten bei der Ninhydrindosierung konnten durch Verwendung des Ninhydrinreagenzes nach KRAMPITZ (1963) bei doppelter Dosierung umgangen werden. Bei der Fördermenge von 30 ml/Stunde wird ein besserer Ventilschluß erzielt, denn durch den Kolben wird die doppelte Flüssigkeitsmenge pro Hub bewegt. Bei der üblichen Dosierung von 15 ml/Stunde bewegt sich der Kolben nur etwa 2 mm hin und her; die Dosiergenauigkeit der Pumpe scheint unter diesen Umständen überfordert zu sein.⁺

Die Ausführung der Pumpe als Doppelkolbenpumpe mit zwangsläufiger Kolbenbewegung hat sich als nachteilig erwiesen. Es ist dadurch nicht möglich, bei gewünschter Pufferförderung die Förderung des Ninhydrinreagenzes zu unterbrechen, ohne die Hubeinstellung der Ninhydrinpumpe auf Null zu drehen. Wie die Erfahrung zeigt, ist mit jeder Neueinstellung des Hubs die Gefahr einer veränderten Durchflußmenge verbunden.

Die Gasabscheidung mittels der oberflächenvergrößernden Glaswolle (SPACKMAN et al. 1958) ist nicht befriedigend. Sie wurde z. B. von KRAMPITZ (1963) durch Teflonwolle bzw. V4A-Stahlwolle ersetzt, um eine bessere und gleichmäßigere Entgasung der Elutionspuffer zu erzielen.

Werden die Elutionspuffer nicht entgast, so bilden sich störende Luftpolster in den Zu- und Druckleitungen. In den Ventilkäfigen setzen sich kleine Gasblasen ab, wodurch das einwandfreie Ventilspiel nicht mehr gesichert ist. Durch die Erwärmung und die Oberflächenvergrößerung in dem Harz treten aus dem Puffer Gasblasen aus. Die Folge ist ein Abreißen der Harzfüllung. Auch unter der Fritte der Trennsäule sammeln sich Gasblasen an, die den kontinuierlichen Abfluß des Eluats stören. Durchqueren Gasblasen die Colorimeterküvette, so bewirken sie durch ihre starke Lichtbrechung, daß sich die Basislinie in einzelne Punkte auflöst. Die zum Regenerieren verwendete Lauge und der Equilibrierpuffer sind sehr gasreich. Das sich im Harz absetzende Gas wird nur durch einen gut entgasten Puffer zur Auflösung gebracht. Der im nicht entgasten Puffer enthaltene Luftsauerstoff macht durch seine das Ninhydrinreagenz nachteilig beeinflussende Reaktion die Anfärbung der Aminosäuren zum Teil unkontrollierbar.

⁺ Inzwischen konnte durch technische Verfeinerung der Apparatur auf die Verwendung des üblichen Ninhydrinreagenzes (Seite 34) mit der Dosierung 15 ml/Stunde zurückgegangen werden.

In eigenen Versuchen konnte festgestellt werden, daß die sich im Gasabscheider bildenden Gasblasen durch die "Wolle" am Aufsteigen in das Entlüftungsrohr behindert werden. Die Dosiergenauigkeit der Pumpe wird durch die dadurch bedingten Änderungen des statischen Zulaufdruckes nachteilig beeinträchtigt. Diese Schwächen der Gasabscheidung konnten durch die Benutzung vibrierender Teflonstäbe zur Entgasung behoben werden. Die austretenden Gasblasen steigen kontinuierlich in dem Entlüftungsrohr auf, ohne den Pufferzufluß zu behindern. In Testversuchen wurde außerdem festgestellt, daß diese Art der Entgasung wesentlich intensiver ist.

Die beste Präzisionspumpe und das beste Mischaggregat sind in ihren Leistungen überfordert, wenn die Temperaturschwankungen des analytischen Systems außer acht gelassen werden. Schon SPACKMAN et al. (1958) stellten ein meßbares Triften der Untergrundlinie bei Schwankungen der Raumtemperatur von $\pm 5^{\circ}\text{C}$ fest und schlugen deshalb vor, das Colorimeter zugluftfrei aufzustellen. Nach unserer Ansicht dürften diese Veränderungen der Basislinie nicht durch die Temperaturempfindlichkeit des Colorimeters bedingt sein, denn diese hochempfindlichen Meßgeräte sind thermostabilisiert. Unter der Voraussetzung einer konstanten Förderung der Pumpen entstehen diese mehr oder weniger stark gezackten Schwankungen der Basislinie durch ein gestörtes Mischungsverhältnis von Eluat und Ninhydrinreagenz, die sich ja wesentlich in dem Absorptionsvermögen unterscheiden (Abb. 9/2). Schwankungen der Raumtemperatur bedingen in den Leitungen für Puffer, Ninhydrinreagenz, Eluat bzw. Reaktionsgemisch Volumen- und Druckänderungen, die sich auf die einzelnen Durchflußgeschwindigkeiten auswirken und somit das Verhältnis der Mischung von Ninhydrinreagenz und Eluat beeinflussen. Auch bei einer instabilen Beheizung der Trennsäule kommt es außer der nachteiligen Beeinflussung des Ionenaustausches (Asymmetrie der Chromatogrammkurven) zu einem nicht kontinuierlichen Abfließen des Eluats, wodurch ebenfalls das Mischungsverhältnis gestört wird.

Temperaturänderungen des Reaktionsbades (Gesamtoberfläche der Teflonspirale etwa 15 dm^2) veranlassen in der Hauptsache die angefärbten Aminosäurekomponenten zu störenden Schwingungen in der Colorimeterküvette,

D. MATERIAL

Jungbullenmastversuch

Das Untersuchungsmaterial stammt aus einem Jungbullenmastversuch mit insgesamt 32 Tieren. In dem Versuch sollte der Einfluß einer Gabe von täglich 5 g Methylthiouracil (MTU) pro Tier in der 27tägigen Endmast auf Entwicklung, Schlachtkörperzusammensetzung und Fleischqualität der Jungbullen festgestellt werden. Das Ergebnis der Untersuchungen wurde auszugsweise bereits veröffentlicht (DREPPER und ZUCKER 1963; TERPLAN et al. 1964).

Nach einer Vorperiode von 5 Wochen waren die Tiere in gewichtsgleiche Gruppen (zwei Gruppen mit je 12 Tieren und zwei Gruppen mit je 4 Tieren) eingeteilt worden. Die Futteraufnahme (Einzelfütterung) und einige Ergebnisse des Mastversuchs sind in der Tabelle 2 (Seite 51) aufgezeigt. Für die Berechnung der täglichen Gewichtszunahmen waren bei den Gruppen I und II aus versuchstechnischen Gründen, die hier nicht näher diskutiert werden sollen, nur jeweils 8 Tiere herangezogen worden (Schlachtung 10. 1. und 17. 1. 1963).

Fußnote zu Seite 51

⁺ Das Mischfutter bestand aus:

Weizennachmehl	20
Roggen	14
Gerste	13
Hafer	13
Melasse	10
Sojaschrot	10
Erdnußschrot	10
Mineralstoffgemisch	10
	100,0

⁺⁺ Das Harnstoffmischfutter bestand aus:

Trockenschnitzel	60
Gerste	9
Hafer	7
Roggen	4
Melasse	8
Futterharnstoff (mit 8% Kaolin, 262 % Rohproteinäquivalent)	7
Mineralstoffmischung	5
	100,0

Tabelle 2: Futterverzehr und Entwicklung der Versuchstiere

Gruppenbezeichnung	I (Kontrolle)	II (MTU)	III (Harnstoff)	IV (Harnstoff + Kraftfutter)
Tiere pro Gruppe	12	12	4	4
Durchschnittliche Futtermittel- aufnahme kg/Tier und Tag				
Trockenschnitzel	2,9	2,5	-	-
Trockentreber	2,0	2,0	-	1,4
Weizenbollmehl	1,0	1,0	1,0	1,0
Melasse	-	-	2,0	2,0
Mischfutter ⁺	2,0	1,9	-	1,4
Harnstoffmischf. ⁺⁺	-	-	2,9	2,9
Heu	2,9	2,5	-	-
Haferstroh	-	-	3,9	2,9
(Harnstoff in g/Tag)	-	-	200	200
Methylthiouracil (g/Tag)	-	5	5	5

g verd. Protein/ Tier und Tag	1030	993	991	1402
Stärkeeinheiten	4856	4620	3526	4977
Harnstoff-N in % des Gesamt-N	-	-	40	28

Endgewicht, kg	456	493	435	449
g tägl. Zunahmen	1379	2550	1130	2000
Magen- und Darmgew. in % d. Schlachtgew.	16,5	18,4	nicht bestimmt	
Wassergehalt der Muskulatur, %	75,6	76,6	nicht bestimmt	
Rohproteingehalt der Muskulatur, %	22,0	21,0	nicht bestimmt	

⁺, ⁺⁺ s. Seite 50, unten

Die Schlachtung der Tiere erfolgte in wöchentlichen Abständen. Hierbei wurden jeweils vier Tiere der Gruppen I und II am 2. 1. ; 10. 1. und 17. 1. sowie die Tiere der Gruppen III und IV am 7. 2. 1963 geschlachtet. Bei den Tieren der Gruppen III und IV waren die Methylothiouracilgaben, jeweils für beide Gruppen gleich, 60, 48 und 24 Stunden vor der Schlachtung abgesetzt worden. Alle Tiere wurden 18 Stunden vor der Schlachtung das letzte Mal gefüttert.

Gewinnung des Materials

Zur Bestimmung des Aminosäurenmusters der Pansenmikroorganismen wurde sofort nach Schlachtung pro Tier etwa 1 kg gut durchgemischten Panseninhaltes von Hand entnommen und durch dreifache Gaze grob filtriert. Der so gewonnene Pansensaft der Einzeltiere wurde zu gleichen Anteilen zu einer Mischprobe innerhalb der jeweiligen Fütterungsgruppe vereint und in Thermosgefäßen warmgehalten. Die Temperatur des Pansensafte lag nach Erreichen des Labors zwischen $+30$ und $+35^{\circ}\text{C}$. Etwa zwei Stunden nach der Probeentnahme begann die Aufbereitung des Materials.

Die Trennung der Protozoen von den Bakterien erfolgte nach Angaben von GUTIERREZ (1955) und COLEMAN (1958). In einer beheizten ($+38/39^{\circ}\text{C}$) und mit sauerstofffreiem Stickstoff (Kupferturm) begasten Zentrifuge wurde der Pansensaft 5 Minuten mit 1000 U/Minute zentrifugiert. Der die Bakterien enthaltende Überstand war bei mikroskopischer Kontrolle bis auf vereinzelt vorkommende, kleine Entodinen (E. simplex) frei von Protozoen, die im Rückstand enthalten waren.

Dem Überstand mit den Bakterien wurde Aceton im Verhältnis 1 : 1 zugesetzt, um eine schnellere Sedimentation durch Denaturierung des Bakterien-eiweißes zu erreichen. Der Hauptteil der sich an der Flüssigkeitsoberfläche ansammelnden Pflanzenteilchen wurde abgesaugt. Nach dem Zentrifugieren (10000 U/Minute; 30 Minuten) befand sich die Bakterienmasse nahezu quantitativ im Rückstand. Verunreinigungen durch kleinste Pflanzenpartikel konnten durch mehrmaliges Auswaschen mit Aceton, Zentrifugation (5000 U/Minute; 10 Minuten) und Absaugen des Überstandes entfernt werden. Die so gereinigten Rückstände wurden bei Zimmertemperatur getrocknet, in Mörser homogenisiert und bis zur Aminosäurenbestimmung fest verschlossen aufbewahrt.

Die nach dem ersten Zentrifugieren (s.o.) im Rückstand befindlichen Protozoen wurden in einen Scheidetrichter unter Stickstoffatmosphäre bei $+38/39^{\circ}\text{C}$ zusammen mit einer 0,5% Glucose enthaltenden Pufferlösung (COLEMAN 1958)⁺ inkubiert. Durch Aufnahme der Glucose sank die Hauptmasse der Einzeller nach etwa 20 Minuten infolge zunehmenden Gewichtes zu Boden. Die durch Gärungsprozesse an die Flüssigkeitsoberfläche gelangenden Futterreste wurden vorsichtig abgesaugt. Durch mehrmaliges Waschen mit Puffer ohne Glucosezusatz konnten die Protozoen von noch anhaftenden Pflanzenteilchen nahezu vollständig befreit werden. Zur Erfassung der teilweise noch im Puffer verbleibenden kleinen Protozoenarten (vor allem Entodinien und Dasytrichen) war es nötig, die beim Waschen verwendeten Puffermengen zu zentrifugieren (2000 U/Minute; 10 Minuten). Die sich im Rückstand befindlichen Ciliaten wurden anschließend mit den durch die Glucose-Sedimentation gewonnenen größeren Formen vereint.

Danach erfolgte die Inkubation der Protozoen in Puffer⁺ unter Zusatz eines Bakteriostaticums (Chloramphenicol 50 mg/Liter) in einen mit CO_2 -begasten Erlenmeyerkolben bei $+38/39^{\circ}\text{C}$. Durch 12stündiges Stoffwechseln ohne Nahrungsaufnahme bauten die Einzeller ihre Reservekohlenhydrate soweit ab, daß bei der salzsauren Hydrolyse des Materials nicht mit einer Zerstörung der Aminosäuren durch zu hohe Kohlenhydratkonzentrationen (KOFRANYI 1950; SLUMP 1966) gerechnet werden mußte. Nach Zusatz von Formalin zum Puffer (Endkonzentration 1%) wurden die abgetöteten Protozoen durch Zentrifugieren (5000 U/Minute; 30 Minuten) als Rückstand gewonnen. Die Reinigung und Aufbewahrung der Protozoenmasse erfolgte in der bei den Bakterien beschriebenen Weise.

Die Bestimmung des Stickstoffs im Untersuchungsmaterial erfolgte nach der üblichen Mikrokjeldahlmethode in der PARNASS-Apparatur. Nach Multiplikation des gefundenen Stickstoffgehaltes mit dem Faktor 6,25 ergab sich der Rohproteingehalt.

⁺ Zusammensetzung des Puffers:

— pH 6,9 —	g/Liter Aqua dest.
K_2HPO_4	6,30
KH_2PO_4	4,90
NaCl	0,63
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,09
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,09
Na-acetat, wasserfrei	0,75

E. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie aus der Tabelle 2 (Seite 51) ersehen werden kann, unterscheiden sich die Gruppen I und II nur durch eine um etwa 8% höhere Futteraufnahme bei der Gruppe I und durch die Zugabe von täglich 5 g Methylthiouracil bei der Gruppe II. Trotz der annähernd gleichen Futteraufnahme konnte bei den Tieren der MTU-Gruppe gegenüber den Jungbullen der Kontrollgruppe während der Versuchszeit eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 1171 g pro Tag festgestellt werden. Dies entsprach allerdings nur einem Mehransatz von umgerechnet täglich 66 g Protein, da das Magen-Darm-Gewicht und der Wassergehalt der Muskulatur bei den Tieren der Gruppe II wesentlich höher lag (vgl. Tabelle 2). Der berechnete wahre Mehransatz von insgesamt 1,8 kg Protein war statistisch nicht zu sichern, da zur Berechnung der Wassergehalt von Stichproben aus der Körpermuskulatur als repräsentativ für das gesamte Muskelfleisch angenommen wurde. Einen entscheidenden Unterschied zwischen beiden Gruppen stellt das auf die Methylthiouracilgabe zurückzuführende höhere Gewicht und die erhöhte Pansenfüllung bei den Tieren der Gruppe II dar. Die höhere Pansenfüllung wurde durch Wägung nach der Schlachtung ermittelt. Sie ist in der Tabelle nicht aufgezeichnet.

Aus Tabelle 2 geht ferner hervor, daß die Gruppen III und IV ein geringwertiges Grundfutter in der Ration erhielten, die durch Harnstoffgaben und bei Gruppe IV außerdem durch eine kleine Kraftfutterzulage verbessert wurde. Durch Entzug des Kraftfutters in Gruppe III war daher eine extensive Fütterung gegeben. Die bei Gruppe IV erhöhte Gewichtszunahme dürfte somit im wesentlichen auf die gegenüber Gruppe III vermehrte Zufuhr von verdaulichem Protein und Stärkeeinheiten zurückzuführen sein.

Die oben genannten Unterschiede in der Fütterung der einzelnen Gruppen sowie die Verabreichung von Methylthiouracil haben möglicherweise einen Einfluß auf die synthetische Leistung der mikrobiellen Population des Pansens. So fällt zum Beispiel auf, wie in Tabelle 3 aufgezeigt, daß der Rohproteingehalt sowohl der Protozoen- als auch der Bakterienfraktion bei denjenigen Gruppen höher ist (15 - 20%), die eine Zulage von Methylthiouracil erhielten, während zwischen diesen Gruppen (II, III, IV) keine deutlichen Unterschiede zu verzeichnen sind. Der Rohproteinanteil in der Trokensubstanz ist - abgesehen von Gruppe I - bei den Protozoenfraktionen um

durchschnittlich 10 Prozent niedriger als bei den Bakterienfraktionen.

Tabelle 3: Rohproteingehalte in % der mikrobiellen Trockensubstanz (T.S.) und prozentuale Anteile des Gesamtstickstoffs der Aminosäuren (AS-N) am Rohproteinstickstoff (RP-N)

Gruppe	Protozoen		Bakterien	
	Rohprotein in % d. T.S.	$\frac{AS-N \times 100}{RP-N}$	Rohprotein in % d. T.S.	$\frac{AS-N \times 100}{RP-N}$
I	39,9	82,4	40,3	72,8
II	44,6	80,3	50,9	72,3
III	47,8	81,5	52,3	69,7
IV	46,1	77,6	49,3	70,9

Warum dieser Unterschied gerade bei den Mikroorganismen der mit MTU behandelten Tiere auftritt und nicht bei denjenigen der Gruppe I, läßt sich schwer erklären. Vergleicht man die eigenen Daten mit den Angaben anderer Autoren (McNAUGHT et al. 1950), so fallen besonders in Hinblick auf den Rohproteingehalt in Protozoen bemerkenswerte Differenzen auf. So wurde dieser mit nur 26 Prozent angegeben, nach den eigenen Ermittlungen liegt er bei 40 - 48 Prozent. Diese Unterschiede können im wesentlichen darauf zurückgeführt werden, daß Protozoen in beachtlichem Maße Kohlenhydrate als intrazelluläre Polysaccharide einlagern. So haben McNAUGHT et al. gezeigt, daß die von ihnen isolierten Protozoenzellen 62% an Polysacchariden enthalten, denn diese Zellen wurden unmittelbar nach der Abtrennung aus dem Pansensaft für die Analyse aufbereitet. Im Falle der eigenen Untersuchung dagegen konnten die Protozoen solche Polysaccharide während einer 12stündigen Inkubation (vgl. Seite 53) endogen umsetzen. Der Rohproteingehalt der Protozoenfraktion wird also hauptsächlich davon abhängen, bis zu welchem Grade die intrazellulären Polysaccharide abgebaut werden. Auch das in diesen Untersuchungen aufbereitete Protozoenmaterial hat wahrscheinlich noch solche Substanzen enthalten. Darauf läßt ein Befund

(JOHNSON et al. 1944) schließen, der für Protozoen einen Proteingehalt von 55 % angibt. Aus dieser Sicht verlieren Unterschiede im Rohprotein-gehalt zwischen Protozoen und Bakterien an Bedeutung. Im Gegensatz zu den Protozoen weisen die Bakterien des Pansens einen weitgehend konstanten Gehalt an Rohprotein auf, der nach verschiedenen Angaben (McNAUGHT et al. 1950; 1954; JOHNSON et al. 1944) sowie nach den eigenen Analysen etwa zwischen 40 und 50 % liegt.

Der prozentuale Anteil des Gesamtstickstoffs der Aminosäuren am Rohproteinstickstoff der Protozoen- bzw. Bakterienfraktionen läßt keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen, liegt aber bei ersteren etwa 10 % höher (vgl. Tab. 3, S. 55). Demnach scheint das Rohprotein der Protozoen mehr Reinprotein⁺ zu enthalten als das der Bakterien. Wie dem Befund von HÖLLE und HARMEYER (1964) zu entnehmen ist, kann jedoch der Reinproteinanteil bei verschiedenen Protozoenformen beachtliche Unterschiede aufweisen. So wurden für die kleinen Protozoenformen 66 % und für die großen Formen 86 % gefunden. In vorliegender Untersuchung an der gemischten Protozoenpopulation war das Verhältnis von kleinen zu großen Formen weitgehend konstant. Daraus erklärt sich, daß der Reinproteinanteil der Protozoenfraktion trotz unterschiedlicher Fütterung keine wesentlichen Abweichungen aufzeigt und in dem von HÖLLER und HARMEYER (1964) gefundenen Bereich liegt.

Die Ergebnisse der Aminosäurenbestimmung im mikrobiologischen Material sind in der Tabelle 4 wiedergegeben.

⁺ Reinprotein = Stickstoff der gebundenen und der freien Aminosäuren multipliziert mit dem Faktor 6,25

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der Protozoen- und Bakterienfraktionen aus dem Rinderpansen
(Aminosäuren-N in % des Gesamt-N)

Amino- säure	Protozoen				Bakterien			
	I	Gruppe			I	Gruppe		
		II	III	IV		II	III	IV
Cys	1,0	0,8	0,9	1,0	0,8	0,8	0,6	1,0
Asp	8,8	9,0	9,0	8,9	7,2	6,9	6,9	7,3
Meth	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,3	1,5	1,6
Thre	3,3	3,5	3,8	3,6	3,8	3,8	3,8	3,9
Ser	3,6	3,7	3,9	3,5	3,5	3,6	3,7	3,3
Glu	6,8	7,1	7,0	7,1	5,5	5,5	5,2	5,7
Pro	2,1	1,9	2,0	2,1	1,6	1,7	1,6	1,7
Gly	5,0	4,4	4,9	4,7	4,9	5,2	5,6	5,1
Ala	3,4	3,0	3,4	3,2	6,2	6,1	5,1	5,1
Val	3,7	3,6	3,7	3,9	4,0	3,8	3,7	3,9
DAP	-	-	-	-	0,56	0,77	0,79	0,75
Ileu	4,5	4,5	4,5	4,3	3,5	3,3	3,3	3,3
Leu	5,5	5,6	5,3	5,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Tyr	2,7	2,7	2,7	2,7	2,2	2,2	2,1	2,0
Phe	3,1	3,2	3,2	3,1	2,5	2,3	2,3	2,3
Lys	13,4	12,2	11,4	11,9	9,2	8,6	7,9	8,4
His	4,6	4,2	4,4	4,1	3,4	2,9	2,9	3,0
Arg	9,4	9,4	9,9	9,4	8,0	9,0	8,2	8,0

Bei einem Vergleich der Aminosäurenmuster der einzelnen Protozoenfraktionen läßt sich insgesamt eine bemerkenswerte Einheitlichkeit feststellen. Das gilt insbesondere für die sauren und neutralen Aminosäuren, und bei den Bakterienfraktionen besteht in dieser Hinsicht eine entsprechende Übereinstimmung. Gewisse Gruppenunterschiede lassen sich aber bei den basischen Aminosäuren erkennen. Vor allem bei Lysin zeichnet sich ein etwas erhöhter Gehalt in den Protozoen und Bakterien der Gruppe I ab, bei Histidin tritt diese Abweichung weniger in Erscheinung. In Anbetracht der Tatsache, daß trotz verschiedenartiger Fütterung bei den anderen Aminosäuren keine Differenzen zu verzeichnen sind, mag der für das Lysin erhobene Befund besonders auffallen.

Der Mindergehalt an Lysin könnte bei Gruppe II auf die um etwa 8% verringerte Futteraufnahme zurückzuführen sein. Bei den Gruppen III und IV war offensichtlich der Lysingehalt im Futter limitierend und konnte durch die mikrobielle Synthese nicht in vollem Maße ergänzt werden. Jedenfalls ist der Lysingehalt der von diesen beiden Gruppen gewonnenen Protozoen- und Bakterienfraktionen geringer als bei den Gruppen I und II. Sieht man von diesen verhältnismäßig geringfügigen Unterschieden ab, so kann wohl insgesamt festgestellt werden, daß namentlich bei den Tieren der Gruppe III, die 40% des Gesamt-N als Harnstoff-N erhielten, eine viel stärkere mikrobielle Synthese von Aminosäuren stattgefunden haben muß als etwa bei den Gruppen I und II. Daß die mikrobielle Population des Pansens zu solchen Syntheseleistungen durchaus in der Lage ist, zeigen am deutlichsten die Versuche von DUNCAN et al. (1953), die Harnstoff als einzige Stickstoffquelle verabreichten.

Bei einer Gegenüberstellung des Aminosäuregehaltes in den Protozoen- und Bakterienfraktionen sind hinsichtlich einzelner Aminosäuren deutliche Unterschiede zu erkennen. Zur besseren Übersicht sind diese Unterschiede unter Verwendung der aus den 4 Gruppen errechneten Mittelwerten in der Tabelle 5 (Seite 59) zusammengefaßt.

Tabelle 5: Unterschiede im Aminosäuregehalt
von Protozoen und Bakterien

Amino- säure	Aminosäuren-N in % des Gesamt-N (Mittelwerte der Gruppen I - IV)		Differenz (Prot. - Bakt.)	
	Protozoen	Bakterien	absolut	relativ (Bakt. = 100 %)
Asp	8,9	7,1	+ 1,8	+ 25
Glu	7,0	5,5	+ 1,5	+ 27
Ala	3,3	5,6	- 2,3	- 41
DAP	-	0,56 - 0,79	-	
Ileu (E) ⁺	4,5	3,3	+ 1,2	+ 36
Leu (E)	5,5	4,5	+ 1,0	+ 22
Phe (E)	3,2	2,4	+ 0,8	+ 33
Lys (E)	12,2	8,5	+ 3,7	+ 43
His (E)	4,3	3,1	+ 1,2	+ 38

⁺ (E) = essentiell für den Wiederkäuer

Auffallend ist, daß in den Bakterien nur Alanin in höherer Konzentration als bei den Protozoen gefunden wurde, wenn man von der später zu besprechenden Diaminopimelinsäure (DAP) absieht. Alle anderen in der Tabelle 5 aufgeführten Aminosäuren waren in den Protozoen reichlicher vorhanden als in den Bakterien. Von besonderer Bedeutung erscheint, daß diese Aminosäuren größtenteils - außer Asparaginsäure und Glutaminsäure - im intermediären Stoffwechsel der Säugetiere nicht synthetisiert werden können und damit auch für den Wiederkäuer als essentiell anzusehen sind (HUNGATE 1966). McNAUGHT et al. (1950/1954) haben in Fütterungsversuchen an Ratten gezeigt, daß das Eiweiß der Protozoen gegenüber demjenigen der Bakterien aus dem Rinderpansen einen höheren Nährwert besitzt. Aufgrund seiner Analysen der in Mikroorganismen vorhandenen Aminosäuren

ist WELLER (1957) zu der Auffassung gelangt, daß der höhere Nährwert der Protozoen auf einen vermehrten Gehalt an Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und insbesondere Lysin zurückgeführt werden kann. Wie die eigenen Ergebnisse zeigen, ist auch Histidin in diese Reihe einzubeziehen. Zwar würde dieser Sachverhalt für eine höhere biologische Wertigkeit des Protozoenproteins sprechen, doch lassen weder die Versuche von McNAUGHT et al. (1950/1954) noch die Berechnungen von PURSER und BUECHLER (1966) eine solche Schlußfolgerung zu. Ein höherer Nährwert des Protozoenproteins könnte sicherlich auch auf einen im Vergleich zu den Bakterien erhöhten Gehalt an Reinprotein zurückgeführt werden, der in Zusammenhang mit Tabelle 3 (S. 55) erörtert wurde.

Wie aus den Tabellen 4 (S. 57) und 5 (S. 59) hervorgeht, wurde nur in Bakterienproteinen, nicht aber bei den Protozoen Diaminopimelinsäure festgestellt, eine Aminosäure, die nach Untersuchungen von WORK und DEWEY (1953) zwar in Bakterien und blaugrünen Algen, jedoch nicht in anderen Einzellern enthalten ist. Wie WELLER et al. (1958) gezeigt haben, fehlt diese Aminosäure auch im Protein der Pansenprotozoen, ihr prozentualer Stickstoffanteil am gesamten Bakterienstickstoff macht etwa 0,6% aus. Hinsichtlich der eigenen Analysen zeigt das Fehlen der DAP im Protozoeneiweiß, daß die Trennung von Bakterien und Protozoen in befriedigender Weise gelungen ist. WELLER et al. (1958) benutzten die DAP als quantitativen Indikator zur Berechnung des bakteriellen Proteinanteils am Gesamtprotein im Pansen von Schafen, die ausschließlich Weizenheu erhielten. Seitdem hat die DAP für die Ermittlung der Synthese von Bakterienproteinen im Pansen besondere Bedeutung erlangt (HUNGATE 1966). Generell läßt sich ein aus dem DAP-Gehalt berechneter Faktor nur unter der Voraussetzung verwenden, daß die Konzentration dieser Aminosäure im Bakterieneiweiß weitgehend konstant ist. Der von WELLER et al. (1958) gefundene Gehalt an Diaminopimelinsäure konnte in den eigenen Untersuchungen nur für das von Versuchsgruppe I gewonnene Bakterieneiweiß bestätigt werden. Bei den anderen Gruppen wurden zwar übereinstimmende, aber erhöhte Werte (0,75 - 0,79) ermittelt. Möglicherweise kann hier ein Einfluß der Methylthiouracilgabe nicht ausgeschlossen werden. SYNGE (1953) sowie PURSER und BUECHLER (1966) haben in Untersuchungen an Reinkulturen von Pansenbakterien gezeigt, daß der Gehalt an DAP bei den einzelnen Bakterienarten im Bereich von 0 - 3,4% schwanken kann. Nach diesen Befunden liegt ebenso wie nach den eigenen Ergebnissen die Vermutung nahe, daß der DAP-Anteil am Protein der Pansenflora nicht konstant ist

und für die Berechnung eines Faktors in jedem Experiment neu ermittelt werden muß.

In Tabelle 4 (S. 57) und 5 (S. 59) wurde eine nur bei den Protozoenfraktionen nachzuweisende Substanz nicht aufgeführt, die im Chromatogramm hinter der Cysteinsäure als ninhydrinpositiv regelmäßig eluiert wurde. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um das intermediär aus dem Cystein entstehende Taurin.

In Anbetracht der wenigen Angaben, die bisher über die Aminosäurezusammensetzung der mikrobiellen Pansenpopulation vorliegen, dürfte ein Vergleich der eigenen von Rindern gewonnenen Ergebnisse mit denjenigen interessant erscheinen, die WELLER (1957) an Schafen bzw. HÖLLER und HARMEYER (1964) an Ziegen gefunden haben. Ein solcher Vergleich ist in der Tabelle 6 (S. 62) unter Verwendung der aus den jeweiligen Versuchsgruppen errechneten Mittelwerten dargestellt.

Wie aus dieser Gegenüberstellung zu ersehen ist, ergibt sich eine befriedigende Übereinstimmung der eigenen Analysenwerte mit denjenigen von WELLER sowohl hinsichtlich des Protozoen- als auch des Bakterienproteins. Gewisse Unterschiede sind bei Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure, Alanin und Histidin festzustellen. WELLER hatte bereits die Vermutung geäußert, daß die von ihm für Serin, Threonin, Methionin und Arginin erhaltenen Werte etwas zu niedrig liegen. Die etwas höheren Ergebnisse der eigenen Analysen bestätigen diese Annahme. Größere Differenzen ergeben sich aus einem Vergleich mit den von HÖLLER und HARMEYER (1964) mitgeteilten Werten. Hier sind es bei Protozoen wie bei Bakterien etwa 10 Aminosäuren, deren Gehalte von den eigenen abweichen. PURSER und BUECHLER (1966) haben anhand der von WELLER (1957) sowie von HÖLLER und HARMEYER (1964) gefundenen Daten die "biologische Wertigkeit" der mikrobiellen Proteine berechnet und besonders für das von den letztgenannten Autoren analysierte Bakterieneiweiß eine wesentlich geringere Proteinqualität ermittelt. Auch diese Untersuchung weist auf die aus Tabelle 5 (S. 59) ersichtlichen Differenzen hin, für die sich zur Zeit keine Erklärung geben läßt.

Sieht man von diesen Unterschieden ab, so dürften die eigenen und die von WELLER (1957) mitgeteilten Befunde wohl zu der Folgerung berechtigen, daß die Aminosäurezusammensetzung der mikrobiellen Population im Pansen kaum durch die Beschaffenheit der dem Wiederkäuer verabreichten Diät zu beeinflussen ist. REUSSER et al. (1957) haben die Aminosäuren in

Tabelle 6: Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Angaben anderer Autoren
(Angabe des Aminosäuren-N in % des Gesamt-N)

Amino- säure	Protozoen			Bakterien		
	+))	++)	+++)	+))	++)	+++)
Cys	0,9	1,2	1,1	0,8	0,8	0,7
Asp	8,9	7,9	6,7	7,1	6,8	5,4
Thre	3,6	3,4	3,3	3,8	3,6	2,6
Ser	3,7	2,9	4,5	3,5	2,8	2,9
Glu	7,0	8,3	9,3	5,5	7,0	5,4
Pro	2,0	2,3	3,1	1,7	2,4	2,9
Gly	4,8	5,2	5,6	5,2	6,1	4,3
Ala	3,3	4,4	4,2	5,6	6,5	4,8
Val	3,7	3,9	5,1	3,9	4,4	2,2
Meth	1,5	1,2	0,4	1,5	1,5	1,3
Ileu	4,5	4,6	4,0	3,3	3,7	1,7
Leu	5,5	5,4	5,4	4,5	4,6	2,3
Tyr	2,7	2,2	2,3	2,1	2,1	1,5
Phe	3,2	3,1	3,1	2,4	2,4	1,9
His	4,3	3,0	6,4	3,1	2,7	6,9
Lys	12,2	11,6	13,2	8,5	8,0	8,2
Arg	9,5	9,0	12,8	8,3	9,1	8,7

- +) Eigene Untersuchungen an Rindern
 ++) Untersuchungen von WELLER (1957) an Schafen
 +++ Untersuchungen von HÖLLER und HARMEYER (1964) an Ziegen

19 nicht im Pansen vorkommenden Mikroorganismenarten analysiert. Ein Vergleich mit diesen Daten weist darauf hin, daß die Mikroorganismen des Pansens gegenüber denen der Umwelt in besonderem Maße zur Synthese eines hochwertigen Proteins befähigt sind.

Es wäre interessant, die Veredelung des im Futter angebotenen Rohproteins durch die mikrobielle Eiweißsynthese im Pansen zu untersuchen. Dafür wäre ein Vergleich des Aminosäurenmusters des Futters mit demjenigen des Panseninhalts erforderlich. In den vorliegenden Untersuchungen standen jedoch keine repräsentativen Futterproben für die Aminosäurenanalyse zur Verfügung.

Wie aus den Studien von WELLER et al. (1958/1962) hervorgeht, sind etwa drei Viertel des vom Wiederkäuer verdauten Proteins mikrobiellen Ursprungs. Da dieses Protein nach WELLERs Befunden (1957) und den eigenen Ergebnissen auch bei unterschiedlicher Fütterung und bei teilweisem Ersatz des Nahrungsproteins durch nichteiweißartige Stickstoffverbindungen wie Harnstoff eine weitgehend konstante Zusammensetzung aufweist, wird der Intermediärstoffwechsel des Wiederkäuers offenbar mit einem besonders gleichbleibenden Angebot von Aminosäuren versorgt. In dieser Hinsicht befindet sich der Wiederkäuer in einem bemerkenswerten Vorteil gegenüber anderen Herbivoren.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Methodik der automatischen Analyse von Aminosäuren mit Hilfe einer einfachen Apparatur durchgeführt. Ein verbessertes Verfahren diente der quantitativen Bestimmung der Aminosäuren in Protozoen und Bakterien aus dem Pansen von Jungbullen, an denen bei extensiver und intensiver Fütterung die Wirkung von Methylthiouracil (MTU) hinsichtlich Gewichtszunahme und Fleischqualität untersucht wurde.

Im Literaturteil wurde von den mikrobiellen Stoffwechselvorgängen im Pansen berichtet, wobei das Hauptaugenmerk auf die Bedeutung der Pansenmikroorganismen für die Proteinversorgung des Wiederkäuers gerichtet war.

Zur Einführung in die automatische Aminosäurenbestimmung mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie wurden Ionenaustausch, Ninhydrinreaktion und colorimetrische Meßmethode erläutert.

Unter Verwendung einer Apparatur, die nach Angaben von SPACKMAN, MOORE und STEIN erstellt und verbessert wurde, erfolgte die säulenchromatographische Auftrennung der Proteinhydrolysate an dem Ionenaustauscher AMBERLITE IR - 120/III bei $+50^{\circ}\text{C}$. Zur Dosierung des Elutionspuffers und des Ninhydrinreagenzes diente eine Doppelkolbenpumpe mit zwei getrennten Fördersystemen. Die Durchflußgeschwindigkeit des Puffers wurde gleichbleibend auf 30 ml/Stunde gehalten und das Ninhydrinreagenz dem Eluat in konstantem Mengenverhältnis beigemischt. Die Farbentwicklung der Aminosäuren erfolgte innerhalb 20 Minuten in einer Teflonspirale (Länge 50 m; Innendurchmesser 0,9 mm), die sich in einem ständig kochenden Wasserbad befand. Die Extinktionen wurden in einem Colorimeter mit Durchflußküvette kontinuierlich gemessen und durch ein Schreibgerät automatisch als Chromatogramm registriert. An Beispielen konnte die Reproduzierbarkeit der Registrierchromatogramme veranschaulicht und die Temperaturempfindlichkeit der Apparatur aufgezeigt werden.

Zur Aminosäurenanalytik des mikrobiologischen Materials wurde Panseninhalt sofort nach Schlachtung der Jungbullen entnommen und die Zellmasse der Protozoen sowie der Bakterien durch fraktioniertes Zentrifugieren und Glucose-Sedimentation gewonnen.

Protozoen wie Bakterien aus den MTU-Gruppen enthielten gegenüber der Kontrollgruppe 15 - 20% mehr Rohprotein in der getrockneten Zellsubstanz.

Trotz unterschiedlicher Fütterung der Versuchstiere traten zwischen den Gruppen keine definitiven Unterschiede im Aminosäurenmuster der Protozoen- und Bakterienfraktionen auf. Eine Ausnahme hiervon bildet die für die Bakterienfraktion spezifische Diaminopimelinsäure, deren Gehalt im Bakterienprotein bei den MTU-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war.

Während die Bakterieneiweiße mehr Alanin enthielten, wiesen die Protozoenfraktionen höhere Werte für Asparaginsäure und Glutaminsäure sowie für Lysin, Histidin, Isoleucin, Phenylalanin, Leucin auf.

Bei einem Vergleich der eigenen Ergebnisse mit entsprechenden Daten der Literatur wurde eine gute Übereinstimmung mit Angaben über Schafe, eine weniger gute mit solchen über Ziegen gefunden.

Die erhobenen Befunde wurden in Hinblick auf die Proteinsynthese im Pansen und auf ihre Bedeutung für die Versorgung des Wiederkäuers mit Aminosäuren diskutiert.

G. LITERATURVERZEICHNIS

Adams, B.A., E.L. Holmes

E.P. 450 308/9 vom 13. 11. 1934, 553, 233 vom 13. 5. 1943

J. Soc. Chem. Ind. T 54, 1 (1935)

Chem. Age 38, 117 (1938)

D'Alelio, G.F.

USP 2 366 007, 1945 (General Electric Co)

Annison, E.F., D. Lewis

Metabolism in the rumen

Methuen Co. Ltd., London 1959

Beckman Instruments

Handbuch zum Aminosäuren-Analysator Modell 120 B

Beckman Instruments, Spinco-Abteilung

Beyrle, E.

Diss. München 1956

Block, R.J.

in: Nachod F.C. Ion Exchange

New York 295 (1949)

Brüggemann, J., D. Giesecke

in Briggs, M.H.: Urea as a protein supplement

Pergamon Press, Oxford, im Druck

Brüggemann, J., D. Giesecke, K. Drepper

Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 17, 163 (1962)

Brüggemann, J., K. Drepper, H. Zucker

Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 17, 243 (1962)

Condsen, R., A.H. Gordon, A.J.P. Martin

Biochem. J. 38, 224 (1944)

- Condsen, R. et al.
Biochem. J. 62, 443 (1947/48)
- Coleman, G.S.
Nature, London 182, 1104 (1958)
- Crasemann, E.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 19, 68 (1964)
- Doetsch, R.N.
An. Sci. 11, 536 (1952)
- Drepper, K., H. Zucker
Tierzüchter 15, 389 (1963)
- Duncan, C.W., I.P. Agrawala, C.F. Huffman, R.W. Luecke
J. Nutr. 49, 41 (1953)
- Eberlein, R.
Z. wiss. Zool. 59 (1895)
- Ellis, W.C., G.B. Garner, M.E. Muhrer, W.H. Pfander
J. Nutr. 60, 413 (1956)
- Englis, D.T., H.D. Fiess
Ind. & Eng. Chem. 36, 604 (1944)
- Ferber, K.E.
Z. Tierzücht. u. Zücht.biol. 12, 1 (1928)
- Fischer, E.
Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 34, 433 (1901)
- Ford, I.E.
Br. J. Nutr. 14, 485 (1960)
Br. J. Nutr. 16, 409 (1962)
Br. J. Nutr. 18, 445 (1964)

- Gans, R. Jahrb. Preuß. Geol. Landesanstalt 26, 179 (1905)
Chem. Ind. 32, 197 (1909)
- Gordon, A.H., A.J.P. Martin
Biochem. J. 35, 1358 (1941)
- Gutierrez, J.
Biochem. J. 60, 516 (1955)
- Hagemann, O.
Landw. Jb. 20, 264 (1891)
- Hamilton, P.B.
Anal. Chem. 30, 914 (1958)
- Harmeyer, K.
Diss. Hannover 1963
- Henneberg, W., F. Stohmann
Am. Chem. Pharm. 107, 152 (1858)
- Höller, H., J. Harmeyer
Zbl. Vet.med. Reihe A 11, 244 (1964)
- Hörnicker, H.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 19, 92 (1964)
- Hungate, R. E.
The Rumen and its Microbes
Acad. Press New York, London 1966
- Johnson, B.C., T.S. Hamilton, W.B. Robinson, J.C. Garey
J. An. Aci. 3, 287 (1944)
- Karlson, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 4. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 21 (1964)
- Kellner, O., M. Becker
Grundzüge der Fütterungslehre, 12. Auflage
Verlag Paul Parey, Hamburg - Berlin, S. 15 (1959)

- Kellner, O., M. Becker
Grundzüge der Fütterungslehre, 14. Auflage
Verlag Paul Parey, Hamburg - Berlin, S. 312 (1966)
- Kemble, A.R., H.T. McPherson
Biochem. J. 58, 44 (1954)
- Kofranyi, E.
Naturwiss. 37, 91 (1950)
- Kohl, H.
Aminosäuren. Ihre theoretische und praktische Bedeutung
für die klinische Therapie
Editio Cantor KG, Aulendorf i. Württ., S. 191 (1954)
- Kon, S.K., J.W.G. Porter
Proc. Nutr. Soc. 12, XII (1953)
- Kossel, A., F. Kutscher
Hoppe-Seylers Z. f. Physiolog. Chem. 31, 165 (1900)
- Krampitz, G., J. Wieneke
Zt. Tierern. u. Futtermittelkde. 10 - 18 (1955 - 1963)
- Krampitz, G., J. Wieneke
Z. f. Tierern. u. Futtermittelkde. 18, 159 (1963)
- Lemberg, J.
Z. dtsh. geol. Ges. 22, 355 (1870)
28, 519 (1876)
- Lugg, J.W.H.
Advanc. Protein Chem. 5, 229 (1949)
- Mangold, E.
Handbuch der Ernährung und des Stoffwechsels der
landwirtschaftlichen Nutztiere 2
Springer-Verlag, Berlin, S. 156 (1929)

- Mangold, E.
Ergebnisse der Biologie 19, 1 (1943)
- Mangold, E.
Die Verdauung bei den Nutztieren
Akademie-Verlag Berlin, S. 61 (1950)
- Moore, S., D.H. Spackman, W.H. Stein
Analyt. Chem. 30, 1185 (1958)
- Moore, S., D.H. Spackman, W.H. Stein
Federation Proc. 15, 358 (1956)
- Moore, S., D.H. Spackman, W.H. Stein
Federation Proc. 17, 1107 (1958)
- Moore, S., W.H. Stein
J. Biol. Chem. 176, 337 (1948)
- Moore, S., W.H. Stein
J. Biol. Chem. 176, 367 (1948)
- Moore, S., W.H. Stein
J. Biol. Chem. 192, 663 (1951)
- Moore, S., W.H. Stein
J. Biol. Chem. 211, 893 (1954)
- Moore, S., W.H. Stein
J. Biol. Chem. 211, 907 (1954)
- Moore, S.
J. Biol. Chem. 238, 235 (1962)
- Müller, R., G. Krampitz
Z. Tierzücht. u. Züchtungsbiol. 65, 187 (1955)
- McNaught, M.L., J.A.B. Smith, K.M. Henry, S.K. Kon
Biochem. J. 46, 32 (1950)

McNaught, M.L., E.C. Owen, K.M. Henry, S.K. Kon
Biochem. J. 56, 151 (1954)

Orth, A., W. Kaufmann
Die Verdauung im Pansen und ihre Bedeutung für die
Fütterung der Wiederkäuer
Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, 1961

Oxford, A.E.
Expt. Parasitology 4, 569 (1955)

Partidge, S.M.
Biol. J. 44, 521 (1949)
45, 495 (1949)
46, 334 (1950)
48, 313 (1951)

Pope, C.G., M.F. Stevens
Biochem. J. 33, 1070 (1939)

Purser, D.B., S.M. Buechler
J. Dairy Sci. 49, 81 (1966)

Reusser, F., J.F.T. Spencer, H.R. Sallans
Canad. J. Microbiol. 3, 727 (1957)

Rolle, M., I. Peschek
Münch. Tierärztl. Wschr. 69, 248 (1956)

Ruhemann, S.
J. Chem. Soc. London 97, 1438, 2025 (1909)

Samuelson, O.
Ion Exchangers in Analytical Chemistry
John Wiley and Sons, Inc., New York 1953

Schwerdtfeger, E.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 16, 58 (1961)

Van Slyke, D.D. et al.

J. biol. Chem. 9, 185 (1911)

12, 275 (1912)

Van Slyke, D.D., D.A. MacFadyen, P. Hamilton

J. biol. Chem. 141, 627, 671 (1941)

Slump, P.

Beckman Report 1/66 (1966)

Beckman Instruments

Sörensen, S.P.L.

Biochem. Z. 7, 45 (1907)

Spackman, D.H., S. Moore, W.H. Stein

Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

Stählin, A.

Handbuch der landwirtschaftl. Versuchs- und Untersuchungsmethodik

Neumann-Verlag Radebeul, Berlin, S. 94 (1957)

Stahl, E.

Dünnschicht-Chromatographie

Springer Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg 1962

Synge, R.L.M.

Biochem. J. 38, 285 (1944)

J. gen. Microbiol. 9, 407 (1953)

Terplan, G., L. Kotter, B. Rolle, H. Geist

Fleischwirtschaft 44, 457 (1964)

Thompson, H.S.

J. Roy. Agr. Soc. Engl. 11, 68 (1850)

Trier, H.J.

Z. f. vergl. Physiologie 4, 305 (1926)

Troll, W., R.K. Cannan

J. biol. Chem. 200, 803 (1953)

Way, J.T.

J. Roy. Agr. Soc. Engl. 11, 313 (1850)

Weller, R.A.

Austr. J. Biol. Sci. 10, 384 (1957)

Weller, R.A., F.V. Gray, A.F. Pilgrim

Brit. J. Nutr. 12, 421 (1958)

16, 83 (1962)

Willstätter, R., E. Waldschmidt-Leitz

Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 54, 2988 (1921)

Winogradowa-Fedorowa, T.

Zbl. Bakt., Abt. 2 78, 246 (1929)

Work, E., D.L. Dewey

J. gen. Microbiol. 9, 394 (1953)

Zuntz, N.

Pflügers Arch. 49, 483 (1891)

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann für die Überlassung des Themas und die großzügig gewährten Arbeitsbedingungen in seinem Institut herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Dr. Kraft Drepper möchte ich meinen aufrichtigen Dank für die jederzeit gewährten Unterstützungen meiner Arbeit aussprechen.

Ebenso danke ich Frau Dr. Karin Walser-Kärst, Herrn Privatdozent Dr. Dieter Giesecke und Herrn Dr. Helmut Erbersdobler für die wissenschaftlichen Anregungen.

LEBENS LAUF

Am 26. 7. 1938 wurde ich, Hanspeter Petry, als Sohn des Studienrats Hermann Petry und seiner Ehefrau Hermine in Kirchheimbolanden/Pfalz geboren.

Durch die Auswirkungen des Krieges gelangte meine Familie im Jahre 1945 nach Landau/Pfalz. Nach dem Besuch der dortigen Volksschule trat ich in das Staatliche Naturwissenschaftliche Gymnasium Landau ein, an dem ich im Jahre 1957 die Reifeprüfung bestand.

Bis zum Jahre 1960 studierte ich Mathematik und Physik an der Technischen Hochschule Karlsruhe bzw. der Universität Saarbrücken. Im Wintersemester 1960/61 begann ich mein tierärztliches Studium, welches ich am 10. 8. 1965 mit der Tierärztlichen Prüfung beendete. Die Praktikantenzeit leistete ich im Institut für Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Universität München und in der tierärztlichen Praxis bei Herrn Dr. H. Wimmer in Aichach/Obb. ab. Die Approbation wurde mir mit Wirkung vom 1. 4. 1966 erteilt.

Seit 1. 4. 1966 bin ich Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten im Institut für Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München in den Jahren 1963/65 angefertigt.

